

PROCÉDÉ DE DISSOCIATION DE LA MOLÉCULE D'HÉMOGLOBINE EXTRACELLULAIRE D'*ARENICOLA MARINA*, CARACTÉRISATION DES CHAÎNES PROTÉIQUES CONSTITUANT LADITE MOLÉCULE ET DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES CODANT POUR LESDITES CHAÎNES PROTÉIQUES

La présente invention a pour objet un procédé de dissociation de la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*, ainsi que la caractérisation des chaînes protéiques constituant ladite molécule.

La présente invention a également pour objet la caractérisation des séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques susmentionnées, ainsi que le procédé de préparation de ces séquences nucléotidiques.

Le sang est un liquide complexe dont la fonction principale est de transporter l'oxygène et le gaz carbonique, afin d'assurer les processus respiratoires. C'est la molécule d'hémoglobine, que l'on trouve dans les hématies, qui assure cette fonction.

La molécule d'hémoglobine de mammifère est formée par l'assemblage de quatre chaînes polypeptidiques fonctionnelles semblables deux à deux (2 chaînes de globine de type α et 2 chaînes de globine de type β). Chacune de ces chaînes polypeptidiques possède la même structure tertiaire d'une molécule de myoglobine (Dickerson et Geis, 1983).

L'hème, site actif de l'hémoglobine, est un anneau protoporphyrinique tétrapyrrolique, contenant en son centre un unique atome de fer. L'atome de fer, fixateur de l'oxygène, établit 6 liaisons de coordinence : quatre avec les atomes d'azote de la porphyrine, une avec l'histidine proximale F8 et une avec la molécule d'oxygène lors de l'oxygénéation de la globine.

On est actuellement confronté aux problèmes d'approvisionnement de sang, dus à la diminution des dons du sang par peur de contamination. Ainsi, la recherche de substituts sanguins s'est accélérée au cours des dernières années. On cherche à concevoir des substituts sanguins artificiels capables d'éliminer les risques de transmission de maladies infectieuses, mais également à s'affranchir des problèmes de compatibilité des groupes sanguins.

Jusqu'à présent, les principales voies de recherche concernent la synthèse de produits chimiques d'une part (Clark et Gollan, 1966) et la synthèse de produits biologiques d'autre part (Chang, 1957 ; Chang, 1964).

En ce qui concerne la première voie de recherche, on a utilisé les perfluorocarbones (PFC). Les PFC sont des produits chimiques capables de transporter l'oxygène et ils peuvent dissoudre une grande quantité de gaz, comme l'oxygène et le dioxyde de carbone.

Actuellement, on essaye de produire des émulsions de ces produits qui pourraient être dispersés dans le sang d'une façon plus efficace (Reiss, 1991 ; Reiss, 1994 ; Goodin et al., 1994).

L'avantage des PFC demeure dans leur capacité oxyphorique directement proportionnelle à la quantité d'oxygène se trouvant dans les poumons. Par ailleurs, en raison de l'absence de membrane à traverser, les PFC peuvent transporter l'oxygène plus rapidement vers les tissus. Toutefois, on ne connaît pas les effets à long terme de la rétention de ces produits dans l'organisme. Lorsque ces produits ont été utilisés pour la première fois comme substitut sanguin dans les années 1960 chez la souris (Clark et Gollan, 1966 ; Geyer et al., 1966 ; Sloviter et Kamimoto, 1967), les effets secondaires ont été très importants. Les PFC n'étaient pas éliminés de la circulation d'une façon satisfaisante et s'accumulaient dans les tissus de l'organisme, ce qui provoquait des œdèmes.

Dans les années 1980, on a testé une nouvelle version de PFC en phase clinique. Mais les problèmes de stockage, de coût financier, d'effets secondaires non négligeables et la faible efficacité de ce composé ont empêché l'extension de sa commercialisation (Naito, 1978 ; Mitsuno et Naito, 1979 ; Mitsuno et Ohyanagi, 1985).

Récemment, on a mis au point une nouvelle génération de PFC (PFBO perfluoroctylbromide). Un nouveau produit (Reiss, 1991) est en cours de test clinique aux Etats-Unis, mais on a déjà constaté qu'une augmentation de la quantité d'oxygène dans le sang peut engendrer une accumulation d'oxygène dans les tissus, ce qui est dangereux pour l'organisme (formation d'oxygène radicalaire de type superoxyde).

Ainsi, malgré les progrès réalisés au fur et à mesure, les effets secondaires de ces composés sont encore trop importants pour être commercialisés à grande échelle.

En ce qui concerne la deuxième voie de recherche, des chercheurs ont travaillé sur la mise au point de substituts sanguins en modifiant la structure de l'hémoglobine naturelle (Chang, 1957 ; Chang, 1997). Pour obtenir un substitut sanguin de type

hémoglobine modifiée, on utilise des hémoglobines synthétisées par des microorganismes génétiquement modifiés, ou d'origine humaine ou animale, notamment la molécule d'hémoglobine bovine. En effet, l'hémoglobine bovine est légèrement différente de l'hémoglobine humaine sur le plan immunologique, mais elle transporte plus facilement l'oxygène vers les tissus. Néanmoins, le risque de contamination virale ou de type encéphalopathie spongiforme reste toujours important.

Pour être fonctionnelle, l'hémoglobine doit être en contact avec un effecteur allostérique le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG), présent uniquement à l'intérieur des globules rouges (Dickerson et Geis, 1983). De plus, sans le 2,3-DPG et d'autres éléments présents dans les globules rouges comme la méthémoglobine réductase, l'hémoglobine subit un processus d'auto-oxydation et perd sa capacité à transporter de l'oxygène ou du dioxyde de carbone.

On peut éliminer ces processus en modifiant la structure de l'hémoglobine, et plus précisément en stabilisant les liaisons faibles de la molécule tétramérique entre les deux dimères α et β (Chang, 1971). De nombreuses modifications ont été testées : liaison covalente entre deux chaînes α , entre deux chaînes β ou encore entre α et β (Payne, 1973 ; Bunn et Jandl, 1968).

On a également tenté de polymériser les molécules tétramériques ou de les conjuguer avec un polymère nommé polyéthylène glycol (PEG)(Nho et al., 1992). Ces modifications ont pour conséquence de stabiliser la molécule et d'augmenter sa taille, empêchant son élimination par les reins.

On a beaucoup étudié les Annélides pour leur hémoglobine extracellulaire (Terwilliger, 1992 ; Lamy et al., 1996). Ces molécules d'hémoglobine extracellulaire sont présentes chez les trois classes d'Annélides : Polychètes, Oligochètes et Achètes et même chez les Vestimentifères. Ce sont des biopolymères géants, constitués d'environ 200 chaînes polypeptidiques appartenant à 6 ou 8 types différents que l'on regroupe généralement en deux catégories. La première catégorie, comptant 144 à 192 éléments, regroupe les chaînes polypeptidiques dites "fonctionnelles" portant un site actif et capables de lier réversiblement l'oxygène ; ce sont des chaînes de type globine dont les masses sont comprises entre 15 et 18 kDa et qui sont très similaires aux chaînes de type α et β de vertébrés. La deuxième catégorie, comptant 36 à 42 éléments, regroupe les chaînes polypeptidiques dites de "structure" possédant peu ou pas de site actif mais permettant l'assemblage des douzièmes.

Les premières images obtenues sur des hémoglobines extracellulaires d'Arénicole (Roche et al., 1960) ont révélé des structures hexagonales. Chaque molécule d'hémoglobine est constituée de deux hexagones superposés (Levin, 1963 ; Roche, 1965) que l'on dit en "bicouche hexagonale" (hexagonal bilayer) et chaque hexagone est lui-même formé par l'assemblage de six éléments en forme de goutte d'eau (Van Bruggen et Weber, 1974 ; Kapp et Crewe, 1984), nommés structure globulaire creuse (hollow globular structure)(De Haas et al., 1996) ou "douzième". La molécule native est formée de douze de ces sous-unités, d'une masse moléculaire d'environ 250 kDa.

Ainsi, le brevet français n°2 809 624 concerne l'utilisation comme substitut sanguin d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina*, un Annélide Polychète de l'écosystème intertidal, ledit substitut sanguin permettant d'éliminer les problèmes de pénurie de dons.

Bien que l'architecture globale de l'hémoglobine de *Arenicola marina* soit connue, notamment grâce à son étude quaternaire fine par spectrométrie de masse (Zal et al., 1997), les séquences primaires des différentes chaînes protéiques qui la composent ne le sont pas.

Ainsi, la présente invention a pour but de fournir les séquences protéiques qui composent la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*.

Un autre but de la présente invention consiste à fournir les premières étapes de la synthèse *in vitro* d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* afin d'élaborer un substitut sanguin au moyen de procédés de biochimie et de biologie moléculaire.

Un autre but de la présente invention consiste à fournir un procédé de préparation de la molécule d'hémoglobine, éventuellement simplifiée, par génie génétique, et ce afin notamment d'augmenter le stock de cette molécule dans le cadre d'une utilisation comme substitut sanguin.

La présente invention concerne un procédé de dissociation de la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*, permettant l'obtention des chaînes protéiques constituant ladite molécule,

ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina* avec au moins un agent dissociant, notamment un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercptoéthanol et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres.

La présente invention concerne un procédé d'obtention des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*,

ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina* avec au moins un agent dissolvant, et le cas échéant un agent réducteur, notamment un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptopropanol et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres.

Par "hémoglobine extracellulaire", on désigne une hémoglobine non contenue dans les cellules et dissoute dans le sang.

L'expression "dissociation" désigne un traitement chimique capable de rompre les interactions faibles (hydrophobes, électrostatiques, hydrogènes...).

Par "tampon de dissociation", on désigne un liquide contenant un tampon permettant d'ajuster le pH et contenant des agents dissolvants.

L'expression "agent dissolvant" désigne un composé chimique capable de rompre les interactions faibles (hydrophobes, électrostatiques, hydrogènes...). Ledit agent dissolvant est notamment choisi parmi : les ions hydroxydes, l'urée ou des ions hétéropolytungstates ou des sels de guanidinium ou du SDS (sodium dodécyl sulfate).

L'expression "réduction" désigne un traitement chimique capable de rompre les interactions fortes telles que les ponts disulfures.

L'expression "agent réducteur" désigne un composé chimique capable de rompre les interactions fortes telles que les ponts disulfures.

Les dix chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* comprennent 8 chaînes de type globine et 2 chaînes de type structure.

On rappelle que l'hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina* d'une masse de 3648 ± 24 kDa est constituée de 198 chaînes polypeptidiques appartenant à 10 types différents regroupés en deux catégories :

– la première (156 chaînes) regroupe des chaînes polypeptidiques dites "fonctionnelles" portant un site actif capable de lier réversiblement l'oxygène ; ce sont des chaînes de type globine dont les masses sont comprises entre 15 et 18 kDa ; ces chaînes sont très similaires aux chaînes de types α et β des vertébrés ; et

– la deuxième (42 chaînes) regroupe des chaînes polypeptidiques dites de "structure" (ou "linker") possédant peu ou pas de site actif mais permettant l'assemblage des dodécamères ; ces chaînes ont des masses moléculaires comprises entre 22 et 27 kDa.

La présente invention concerne un procédé de dissociation de la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina*, permettant l'obtention des chaînes protéiques constituant ladite molécule,

ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* avec un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) et d'un tampon de dissociation, pendant environ une heure à trois semaines.

Un procédé de dissociation avantageux de l'invention est caractérisé en ce que le tampon de dissociation comprend un agent tamponnant à une concentration comprise d'environ 0,05 M à environ 0,1 M, notamment du Trisma (tris[hydroxyméthyl]aminométhane), de l'hepes, du phosphate de sodium, du borate de sodium, du bicarbonate d'ammonium ou de l'acétate d'ammonium, et 0 à 10 mM d'EDTA ajusté à un pH compris d'environ 5 à environ 12, et de préférence d'environ 7,5 à 12, le tout étant notamment ajusté à un pH compris d'environ 2 à 12, et de préférence d'environ 5 à 12.

De préférence, ledit tampon de dissociation comprend de l'EDTA à une concentration d'environ 1 mM ajusté à un pH d'environ 10, notamment avec une solution de soude 2N.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention est caractérisé en ce que les chaînes protéiques constituant ladite molécule sont obtenues par la réduction de quatre sous-unités par un agent réducteur, par exemple en présence de DTT, lesdites sous-unités étant elles-mêmes obtenues par mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* avec différents agents dissociants, notamment un tampon de dissociation.

La molécule native se dissocie en sous-unités sous l'action d'agents dissociants non réducteurs. Il n'y a donc pas rupture des liaisons covalentes. Toutefois, après l'action d'un agent réducteur (coupure des liaisons covalentes), les sous-unités sont réduites en chaînes polypeptidiques (chaînes protéiques constituées de l'assemblage d'acides aminés).

Les 4 sous-unités susmentionnées sont donc : les monomères, les dimères, les trimères et les dodécamères.

Les monomères sont des chaînes de globine.

Les dimères sous forme homo et héterodimères sont des chaînes de structure.

Les trimères sont des assemblages covalents de trois chaînes de globine.

Les dodecamères sont constitués de 12 chaînes protéiques ; par exemple : 3 trimères + 3 monomères, 2 trimères + 6 monomères, 1 trimère + 9 monomères.

On peut donc obtenir les chaînes protéiques soit en une seule étape par réduction directe de l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina*, soit en deux étapes, l'une consistant en la dissociation de l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* en 4 sous-unités et l'autre en la réduction desdites 4 sous-unités en chaînes protéiques.

La présente invention concerne également un procédé de dissociation tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que les agents dissociants utilisés pour obtenir les 4 sous-unités susmentionnées sont les suivants :

- une solution tampon de dissociation comprenant : 0,1 M de base Trisma (tris[hydroxyméthyl]aminométhane) et 0 à 10 mM d'EDTA ajusté à un pH compris d'environ 5 à environ 12, et de préférence d'environ 7,5 à environ 12, et
- une solution d'urée dont la concentration est comprise d'environ 0,1 M à environ 8 M, et est notamment égale à 3 M.

La présente invention concerne également un procédé de dissociation tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que les agents dissociants pour obtenir les 4 sous-unités sont les suivants :

- une solution tampon de dissociation comprenant 0,1 M de base Trisma et 1 mM d'EDTA ajusté à pH 10, et
- 3 M d'urée.

La présente invention concerne également un procédé de dissociation et DE réduction tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que les agents dissociants et réducteurs utilisés pour obtenir les chaînes protéiques sont les suivants :

- une solution tampon de dissociation comprenant : 0,1 M de base Trisma (tris[hydroxyméthyl]aminométhane) à un pH compris d'environ 8 à environ 9, et
- une solution d'urée dont la concentration est comprise d'environ 4 M à environ 8 M, et est notamment égale à 8 M, et
- 1 à 10% DTT

ou

- une solution tampon de dissociation comprenant : 0,1 M de bicarbonate d'ammonium à un pH compris d'environ 8 à environ 9, et
- 1 à 10% DTT

Le procédé de dissociation et de réduction de l'invention permet d'obtenir une composition contenant le mélange des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina*.

La présente invention concerne également un procédé de préparation de couples d'amorces à partir des chaînes protéiques telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- l'isolement de chacune des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini ci-dessus,
- le microséquençage de chacune des chaînes protéiques isolées susmentionnées par spectrométrie de masse et séquençage d'Edman, afin d'obtenir une microséquence correspondant à chacune des séquences constituées de 5 à 20 acides aminés, et
- la détermination des amorces dégénérées à partir des microséquences susmentionnées.

La première étape d'isolement des chaînes protéiques est notamment effectuée par chromatographie liquide en phase inverse et gel bidimensionnel à partir du mélange susmentionné comprenant les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine telles qu'obtenues selon le procédé de dissociation et de réduction de l'invention.

L'expression "microséquence" désigne des fragments de séquences protéiques.

Les microséquences susmentionnées peuvent provenir à la fois des extrémités C- et N-terminales mais aussi de séquences internes.

Les chaînes protéiques peuvent être obtenues par chromatographie liquide en phase inverse ou à partir de gel 2D à partir d'hémoglobine purifiée d'*Arenicola marina*. Chaque pic ou tache a été découpé et digéré par une protéase. Les peptides ainsi obtenus ont été extraits des gels et séparés par capLC (chromatographie liquide capillaire). Les fragments sont ensuite analysés par spectrométrie de masse. D'autre part, chaque pic isolé par phase inverse a été analysé par séquençage d'Edman.

L'expression "amorces dégénérées" désigne des séquences nucléotidiques obtenues à partir de fragments de séquences protéiques. On parle d'amorces dégénérées en raison de la dégénérescence du code génétique (plusieurs codons pour 1 acide aminé).

La dernière étape de détermination des couples d'amorces dégénérées correspond à leur synthèse.

Cette étape permet d'obtenir à la fois des amorces sens et des amorces antisens.

La présente invention concerne également des couples d'amorces tels qu'obtenus selon le procédé tel que défini ci-dessus, lesdits couples étant notamment les suivants :

- a) *Amorce sens* : GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG (SEQ ID NO : 21)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- b) *Amorce sens* : TGY GGN ATH CTN CAR CG (SEQ ID NO : 23)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- c) *Amorce sens* : AAR GTI AAR CAN AAC TGG (SEQ ID NO : 24)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- d) *Amorce sens* : TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG (SEQ ID NO : 25)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- e) *Amorce sens* : AAR GTN ATH TTY GGN AGR GA (SEQ ID NO : 26)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- f) *Amorce sens* : GAR CAY CAR TGY GGN GGN GA (SEQ ID NO : 27)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)

où :

R représente A ou G,

Y représente C ou T,

N représente A, G, C ou T,

I représente l'inosine,

H représente A, C ou T.

La présente invention concerne également des couples d'amorces tels qu'obtenus selon le procédé tel que défini ci-dessus, lesdits couples étant notamment les suivants :

- a) *Amorce sens* : GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG SEQ ID NO : 21
Amorce antisens : CCA NGC NTC YTT RTC RAA GCA SEQ ID NO : 28
- b) *Amorce sens* : AN TGY GGN CCN CTN CAR CG SEQ ID NO : 29
Amorce antisens : CCA NGC NTC YTT RTC RAA GCA SEQ ID NO : 28
- c) *Amorce sens* : AAR GTI AAR CAN AAC TGG SEQ ID NO : 24
Amorce antisens : CCA NGC NCC DAT RTC RAA SEQ ID NO : 30
- d) *Amorce sens* : TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG SEQ ID NO : 25
Amorce antisens : CA NGC NYC RCT RTT RAA RCA SEQ ID NO : 31

où :

R représente A ou G,

Y représente C ou T,

N représente A, G, C ou T,

I représente l'inosine,

D représente A, G ou T,

H représente A, C ou T.

La présente invention concerne également un procédé de préparation de séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, à partir des amorces telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il correspond à un procédé d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), comprenant une répétition d'au moins 30 fois du cycle constitué par les étapes suivantes :

- * la dénaturation, par chauffage, de l'ADNc monocaténaire codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de façon à dénaturer d'éventuelles structures secondaires et des reliquats d'ARN, ledit ADNc étant obtenu à partir d'ARNm, cette étape permettant d'obtenir des brins d'ADNc monocaténaires dénaturés,
- * l'hybridation des couples d'amorces tels qu'obtenus par le procédé tel que défini ci-dessus aux brins d'ADNc monocaténaires dénaturés susmentionnés à une température adéquate, pour obtenir des amorces hybridées, et
- * la synthèse du brin complémentaire de l'ADNc par une polymérase à une température adéquate, à partir des amorces hybridées telles qu'obtenues à l'étape précédente.

L'ADNc codant pour les chaînes protéiques susmentionnées est obtenu à partir d'ARNm, ledit ARNm étant obtenu par purification à partir d'ARN totaux extraits sur des Arénicoles juvéniles en pleine croissance, lesdits Arénicoles juvéniles présentant un taux élevé de transcription des différents ARN messagers.

Si le cycle susmentionné est répété moins de 30 fois, l'amplification de l'ADN est réduite.

L'expression "éventuelles structures secondaires" désigne des appariements anarchiques entre deux séquences d'ADNc.

L'expression "dénaturation par chauffage de l'ADNc" désigne la rupture des appariements anarchiques entre deux séquences d'ADNc.

L'expression "hybridation à une température adéquate" désigne la reconnaissance par les amores de leurs séquences complémentaires sur l'ADN matrice.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de préparation de séquences nucléotidiques selon l'invention est caractérisé en ce que :

- la première étape dudit procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina* d'environ 10 secondes à environ 5 minutes à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,
- le cycle, répété environ 30 à 40 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina* d'environ 10 secondes à environ 5 minutes, à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,
 - * une étape d'hybridation des couples d'amores de l'invention aux brins d'ADNc monocaténaires susmentionnés pour obtenir des amores hybridées, d'environ 20 secondes à environ 2 minutes, à une température comprise d'environ 50°C à environ 60°C, de préférence d'environ 50°C à environ 56°C,
 - * une étape d'elongation des amores hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase d'environ 20 secondes à environ 1 minute et 30 secondes, à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation des amores hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase d'environ 5 minutes à environ 15 minutes à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C.

La réaction de PCR du procédé de l'invention est notamment effectuée en présence d'ADNc (5 à 20 ng), d'amorce sens (100 ng) et antisens (100 ng), de dNTP (200 µM final), de MgCl₂ (2 mM final), de tampon PCR (fourni avec la polymérase) (1 X final), de la Taq polymérase (1 unité) et d'eau (25 µl qsp).

Le procédé de préparation de séquences nucléotidiques susmentionné permet d'obtenir des séquences codantes partielles.

Une fois les séquences codantes partielles obtenues grâce aux expériences précédentes, l'amplification et le séquençage de la totalité de la séquence codante des ADNc de globines et du linker sont réalisés par 5' RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) PCR et selon les recommandations protocolaires de la fiche technique fournie par le fournisseur (5'/3' RACE kit, Roche).

La présente invention concerne également un procédé de préparation tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que les couples d'amorces utilisés sont tels que définis précédemment.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est : (GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG ; CCA NGC NTC YTT RTC RAA GCA) ou (GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, Y et N étant tels que définis ci-dessus,
ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténaires susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, de 30 secondes à une température égale à 56°C,
 - * une étape d'elongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 40 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 10 minutes à une température égale à 72°C,
afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 13,
ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1.

La séquence partielle SEQ ID NO : 13 a ensuite été complétée par des expériences 5'RACE PCR comme expliqué ci-dessus. La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 13 est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de globine, notée A2a. SEQ ID NO : 13 comprend 376 nucléotides.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrive et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à la chaîne de globine susmentionnée, notée A2a. SEQ ID NO : 1 comprend 474 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (AN TGY GGN CCN CTN CAR CG ; CCA NGC NTC YTT RTC RAA GCA), N, Y et R étant tels que définis ci-dessus,

ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 4 minutes à une température égale à 95°C,
 - le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténaires susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, de 30 secondes à une température égale à 52°C,
 - * une étape d'elongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 40 secondes à une température égale à 72°C, et
 - la dernière étape du procédé est une étape d'elongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 10 minutes à une température égale à 72°C,
- afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15 est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de globine, notée A2b. SEQ ID NO : 15 comprend 288 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (TGY GGN ATH CTN CAR CG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), N, Y et R étant tels que définis ci-dessus, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 30 secondes à une température égale à 53°C,
 - * une étape d'elongation de 40 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,

afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15,

ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3.

La séquence partielle SEQ ID NO : 15 a ensuite été complétée par des expériences 5'RACE PCR comme expliqué ci-dessus.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrive et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à la chaîne de globine susmentionnée, notée A2b. SEQ ID NO : 3 comprend 477 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est : (AAR GTI AAR CAN AAC TGG ; CCA NGC NCC DAT RTC RAA) ou (AAR GTI AAR CAN AAC TGG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, I, N et D étant tels que définis ci-dessus,

ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour chacune des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 1 minute à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténaires susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, de 1 minute à une température égale à 50°C,
 - * une étape d'elongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 1 minute et 30 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 10 minutes à une température égale à 72°C,
afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 17,
ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5.

La séquence partielle SEQ ID NO : 17 a ensuite été complétée par des expériences 5'RACE PCR comme expliqué ci-dessus. La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 17 est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de globine, notée A1. SEQ ID NO : 17 comprend 360 nucléotides.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrive et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à la chaîne de globine susmentionnée, notée A1. SEQ ID NO : 5 comprend 474 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG ;

CA NGC NYC RCT RTT RAA RCA) ou (TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), Y, H, R et N étant tels que définis ci-dessus,
ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténaires susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, de 40 secondes à une température égale à 52°C,
 - * une étape d'elongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 30 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase de 10 minutes à une température égale à 72°C,

afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 19,

ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7.

La séquence partielle SEQ ID NO : 19 a ensuite été complétée par des expériences 5'RACE PCR comme expliqué ci-dessus. La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 19 est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de globine, notée B2. SEQ ID NO : 19 comprend 390 nucléotides.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrive et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à la chaîne de globine susmentionnée, notée B2. SEQ ID NO : 7 comprend 498 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (AAR GTN ATH TTY GGN AGR GA; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, H, N et Y étant tels que définis ci-dessus,

ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 40 secondes à une température égale à 52°C,
 - * une étape d'elongation de 30 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,

afin d'obtenir une séquence nucléotidique partielle de référence pour continuer la détermination complète de cette séquence codante,

ledit procédé comprenant une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrive et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de globine, notée B1. SEQ ID NO : 9 comprend 498 nucléotides.

Un procédé de préparation particulièrement avantageux selon l'invention est un procédé de préparation de séquences nucléotidiques tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (GAR CAY CAR TGY GGN GGN GA, CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, N et Y étant tels que définis ci-dessus,

ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 40 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 1 minute à une température égale à 58°C,

- * une étape d'elongation de 1 minute et 10 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,
afin d'obtenir une séquence nucléotidique partielle de référence pour continuer la détermination complète de cette séquence codante,
ledit procédé comprenant une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11.

La séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11 (du codon initiateur au codon Stop, c'est à dire la séquence transcrive et traduite qui correspond à un monomère de globine fonctionnel) est une nouvelle séquence nucléotidique codant pour une chaîne protéique correspondant à une chaîne de linker, notée L1. SEQ ID NO : 11 comprend 771 nucléotides.

La présente invention concerne également des séquences protéiques codées par l'une des séquences nucléotidiques telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini ci-dessus.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,
 - ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, notamment d'au moins environ 85%, avec la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,
 - ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 2.

La séquence SEQ ID NO : 2 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne entière de globine, notée A2a.

La séquence SEQ ID NO : 14 est une nouvelle séquence protéique correspondant à un fragment d'une séquence dérivée de la chaîne de globine, notée A2a, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2.

Les propriétés de transport de l'oxygène des séquences protéiques de l'invention peuvent être notamment vérifiées en mesurant leur spectre d'absorption par spectrophotométrie typique de l'oxyhémoglobine.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16, ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,
 - ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16, ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, notamment d'au moins environ 85%, avec la séquence SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,
 - ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 4.

La séquence SEQ ID NO : 4 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne entière de globine, notée A2b.

La séquence SEQ ID NO : 16 est une nouvelle séquence protéique correspondant à un fragment d'une séquence dérivée de la chaîne de globine, notée A2b, représentée par la séquence SEQ ID NO : 4.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,

– ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, notamment d'au moins environ 85%, avec la séquence SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,

– ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 6.

La séquence SEQ ID NO : 6 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne entière de globine, notée A1.

La séquence SEQ ID NO : 18 est une nouvelle séquence protéique correspondant à un fragment d'une séquence dérivée de la chaîne de globine, notée A1, représentée par la séquence SEQ ID NO : 6.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

– la séquence SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20,

– ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,

– ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, notamment d'au moins environ 85%, avec la séquence SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,

– ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 8.

La séquence SEQ ID NO : 8 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne entière de globine, notée B2.

La séquence SEQ ID NO : 20 est une nouvelle séquence protéique correspondant à un fragment d'une séquence dérivée de la chaîne de globine, notée B2, représentée par la séquence SEQ ID NO : 8.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

– la séquence SEQ ID NO : 10,

– ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 10 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,

– ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 10 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, avec la séquence SEQ ID NO : 10, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,

– ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 10.

La séquence SEQ ID NO : 10 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne de globine, notée B1.

Une protéine préférée selon l'invention est une protéine telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

– la séquence SEQ ID NO : 12,

– ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 12 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette l'association des chaînes de globines entre elles,

– ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 12 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, avec la séquence SEQ ID NO : 12, sous réserve que ladite séquence homologue permette l'association des chaînes de globines entre elles,

– ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette l'association des chaînes de globines entre elles, notamment tout

fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 280 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 12.

La séquence SEQ ID NO : 12 est une nouvelle séquence protéique correspondant à une chaîne de Linker, notée L1.

La présente invention concerne également des séquences nucléotidiques telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini ci-dessus.

La présente invention concerne également des séquences nucléotidiques codant pour une protéine telle que définie ci-dessus.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 13 codant respectivement pour SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 13, et codant respectivement pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 13 codant pour une protéine dérivée respectivement de SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 14,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 13, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 1,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

Les conditions de stringence correspondent à des gammes de températures comprises entre 48 et 60°C et de concentrations en MgCl₂ comprises entre 1 et 3 mM.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15 codant respectivement pour SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15, et codant respectivement pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15 codant respectivement pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 4 ou SEQ ID NO : 16,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 ou SEQ ID NO : 15 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 17 codant respectivement pour SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 17, et codant respectivement pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 5

ou SEQ ID NO : 17 codant respectivement pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 18,

– ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 17, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 17,

– ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 17 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,

– ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,

– ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

– la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 19 codant respectivement pour SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20,

– ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 19, et codant respectivement pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20,

– ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 19 codant respectivement pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 20,

– ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 19, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 7,

– ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 19 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,

- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9 codant pour SEQ ID NO : 10,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 9, et codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 10,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 9 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 10,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 9, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 9,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

La présente invention concerne également une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11 codant pour SEQ ID NO : 12,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 11, et codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 12,

– ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 11 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 12,

– ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 11, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 11,

– ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 800 nucléotides contigus dans ladite séquence,

– ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,

– ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

La présente invention concerne un procédé de préparation tel que défini ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

– une étape de mise en présence de la molécule d'hémoglobine susmentionnée avec au moins un agent dissociant et un agent réducteur, notamment un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptopropanoïl et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres,

permettant la dissociation, puis la réduction de ladite molécule d'hémoglobine, afin d'obtenir les chaînes protéiques constituant ladite molécule,

– l'isolement des chaînes protéiques susmentionnées,

– le microséquençage par spectrométrie de masse et le séquençage d'Edman de chacune des chaînes protéiques isolées susmentionnées, afin d'obtenir une microséquence correspondant à chacune des séquences constituées de 5 à 20 acides aminés,

– la détermination des couples d'amorces dégénérées (sens et antisens) à partir des microséquences susmentionnées,

– la préparation des séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques susmentionnées, à partir des amorces telles qu'obtenues précédemment, par un procédé d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), comprenant les étapes suivantes :

– la première étape dudit procédé est une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, d'environ 10 secondes à environ 5 minutes à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,

– le cycle, répété environ 30 à 40 fois, comprend les étapes suivantes :

- * une étape de dénaturation de l'ADNc codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, d'environ 10 secondes à environ 5 minutes, à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,

- * une étape d'hybridation des couples d'amorces de l'invention aux brins d'ADNc monocaténaires susmentionnés pour obtenir des amorces hybridées, d'environ 20 secondes à environ 2 minutes, à une température comprise d'environ 50°C à environ 56°C,

- * une étape d'elongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase d'environ 20 secondes à environ 1 minute et 30 secondes, à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C, et

- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation des amorces hybridées telles qu'obtenues précédemment par une polymérase d'environ 5 minutes à environ 15 minutes à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C.

DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente un chromatogramme de l'hémoglobine de *Arenicola marina* sur colonne Superose 12-C. La courbe supérieure correspond à une absorbance de 414 nm et la courbe inférieure à une absorbance de 280 nm. (Le collecteur est programmé pour collecter entre 16 et 18 minutes).

La Figure 2 représente le spectre UV de l'hémoglobine de *Arenicola marina* fonctionnelle (sous sa forme oxyhémoglobine).

La Figure 3 représente le chromatogramme (à 414 nm) de l'HbAm dissociée (partiellement) obtenu sur Superose 12-C et les traits verticaux sur le chromatogramme correspondent aux fenêtres de collecte (correspondant à la récupération des sous-unités).

La Figure 4 représente un gel SDS-PAGE obtenu pour les différentes fractions collectées.

La Figure 5 représente le chromatogramme (à 414 nm) de l'HbAm dissociée (partiellement) obtenu sur CIM DISK DEAE (système d'échange anionique) et les traits verticaux sur le chromatogramme correspondent aux fenêtres de collecte. La courbe en pointillés indique le gradient.

La Figure 6 représente un gel SDS-PAGE obtenu pour les différentes fractions collectées.

La Figure 7 représente la cinétique de dissociation de l'HbAm en présence d'urée 3M. L'axe des abscisses correspond au nombre de jours et l'axe des ordonnées correspond au pourcentage de dissociation de la molécule native ; la courbe en pointillés correspond au dodécamère ; la courbe avec les carrés noirs au trimère et au "linker" (chaîne de structure) ; la courbe avec les ronds noirs aux monomères.

La Figure 8 représente la cinétique de dissociation de l'HbAm à pH 10. L'axe des abscisses correspond au nombre de jours et l'axe des ordonnées correspond au

pourcentage de dissociation de la molécule native ; la courbe en pointillés correspond au dodécamère ; la courbe avec les carrés noirs au trimère et au "linker" ; la courbe avec les ronds noirs aux monomères.

La Figure 9 représente la cinétique de dissociation de l'HbAm en présence d'urée 3M à pH 10. L'axe des abscisses correspond au nombre de jours et l'axe des ordonnées correspond au pourcentage de dissociation de la molécule native ; la courbe en pointillés correspond au dodécamère ; la courbe avec les carrés noirs au trimère et au "linker" ; la courbe avec les ronds noirs aux monomères.

La Figure 10 représente le suivi de la cinétique de réassociation à partir du pourcentage d'HbAm (HBL) et de Dodécamère (D) et selon la technique de changement de tampon (Centricon ou Dialyse). L'axe des abscisses correspond au nombre de jours et l'axe des ordonnées correspond au pourcentage de dissociation de la molécule native avec la technique Centricon ; la courbe en traits pointillés correspond à HBL avec la technique de dialyse ; la courbe avec les triangles noirs correspond au dodécamère avec la technique Centricon ; la courbe en trait plein correspond au dodécamère avec la technique de dialyse.

La Figure 11 représente la superposition des chromatogrammes de chromatographie d'exclusion au cours de la réassociation correspondant à différents temps de réassociation.

La Figure 12 représente le chromatogramme HPLC obtenu après séparation des chaînes polypeptidiques par phase inverse sur une colonne Symmetry C18 (Waters). Les codes (d2, a1, a2, b2, c) correspondent aux noms des globines telles que mentionnées dans l'article de Zal et al. (1997).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

La présente invention a pour objectif l'utilisation de l'hémoglobine extracellulaire du polychaete marin *Arenicola marina* (HbAm) comme substitut sanguin chez des vertébrés. Cependant, même si ce ver représente une biomasse importante, la synthèse par génie génétique s'avère une voie indispensable et nécessaire. Il est donc primordial d'obtenir les séquences primaires des chaînes protéique constituant HbAm afin de développer une hémoglobine artificielle, fonctionnelle et stable à partir des propriétés d'auto-assemblage de cette molécule. Les protocoles de dissociations de chaque sous-unité et de réduction en chaîne polypeptidique, ainsi que les techniques de purification, d'isolement de microséquençage et de séquençage de ces chaînes et sont développées en détail ci-après.

Extraction et purification de l'hémoglobine

1) Espèce étudiée : *Arenicola marina* ; Annélide de l'écosystème intertidal

L'Annélide Polychète *Arenicola marina* est une espèce sédentaire très répandue sur toutes les côtes de l'Atlantique Nord, de la mer Noire et de l'Adriatique situées au-dessus du quarantième parallèle. Dans la région de Roscoff, l'Arénicole, communément appelée "ver du pêcheur" constitue des populations denses. Le sédiment habité par ces populations présente une surface irrégulière alternant bosses et creux formés respectivement par des monticules de déjections et des dépressions coniques. L'Arénicole vit dans des galeries aménagées dans le sable. La structure de la galerie se présente sous forme de U, avec une branche ouverte sur l'extérieur, l'autre étant fermée. L'Arénicole est logée dans la partie horizontale, son extrémité céphalique orientée vers la partie aveugle. Elle ingère le sable, en extrait la matière organique assimilable et défèque ensuite par son extrémité caudale, formant ainsi des monticules de tortillons de sable. A l'intérieur de l'étage médiolittoral, la répartition et la densité des peuplements sont essentiellement commandées par la granulométrie, la concentration en matière organique et la salinité.

L'Arénicole, vivant surtout dans les zones de balancement des marées, est amenée à subir des variations de pression d'oxygène. Sa galerie lui permet d'être en contact permanent avec l'eau de mer (riche en oxygène), pendant la marée basse.

2) Méthodes d'étude

2.1. Prélèvement du matériel biologique

Les animaux sont récoltés à marée basse, dans la baie de Penpoull, près de Roscoff (France) et maintenus dans l'eau de mer une nuit afin de vider leur tube digestif. Les prélèvements de sang sont effectués à l'aide d'une seringue au niveau du vaisseau dorsal. Les échantillons sont collectés sur de la glace et filtrés sur de la laine de verre. Après une centrifugation à froid (15 000 g pendant 15 min à 4°C) pour éviter la dissociation des molécules et pour éliminer les débris tissulaires, les surnageants sont concentrés au moyen d'une cellule Amicon (Millipore) et d'une membrane de "cut-off" de 500 kDa (ne sont retenues que les masses supérieures à 500 kDa).

2.2. Purification des hémoglobines

Une fois le sang concentré, une filtration basse pression (FPLC) par exclusion (séparation en fonction de la taille de la molécule : plus la molécule est de taille importante plus elle est éluée rapidement) est effectuée sur colonne (100 × 3 cm) de gel Sephadryl S-400 (Amersham)(gamme de séparation comprise entre 20×10^3 et 8000×10^3), en chambre froide (4°C). Chaque purification est effectuée sur 5 mL d'échantillon, élués avec le tampon salé *Arenicola marina* (10 mM Hepes ; 4 mM KCl ; 145 mM NaCl ; 0,2 mM MgCl₂ ajusté à pH 7,0 avec de la soude 2N). Le débit utilisé pour cette première purification est de 40 tr/min et n'est récupéré que la première fraction la plus rouge (contenant de l'hème). Cette fraction est ensuite concentrée à l'aide de tube Centricon-10kDa retenant les molécules d'un poids supérieur ou égal à 10000 Da.

Une deuxième purification est ensuite effectuée par filtration basse pression (Système HPLC, Waters) d'Aliquot de 200 µL sur une colonne 1 × 30 cm Superose 12-C (Pharmacia, gamme de séparation comprise entre 5×10^3 et 3×10^5 Da) à température ambiante. Le débit utilisé est de 0,5 ml/min. Les échantillons sont conservés à 4°C et récoltés dans de la glace. L'absorbance de l'éluat est suivie à deux longueurs d'ondes : 280 nm (pic d'absorbance caractéristique des protéines) et 414 nm (pic d'absorbance caractéristique de l'hème). Les fractions contenant de l'hème sont isolées grâce au collecteur (programmé sur une fenêtre de temps correspondant au temps de rétention de l'hémoglobine)(Figure 1). Les échantillons sont concentrés, dosés, puis stockés à -40°C avant utilisation.

2.3. Dosage des hémoglobines

Le réactif de Drabkin (Sigma), utilisé pour le dosage, permet de déterminer la quantité en hème de la solution. L'hémoglobine réagit avec le réactif de Drabkin lequel contient du potassium de ferricyanure, du cyanure de potassium et du bicarbonate de sodium. L'hémoglobine est transformée en méthémoglobine par l'action du ferricyanure. Les méthémoglobines réagissent ensuite avec le cyanure pour former le cyanométhémoglobine. L'absorbance de ce dérivé à 540 nm est proportionnelle à la quantité d'hème dans la solution. Or, l'hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina* (HBL) contient en moyenne 1 mol d'hème pour 23 000 g de protéine, ce qui permet par un calcul simple, d'obtenir la concentration en HBL de chaque échantillon.

3) Résultats

Ainsi, plusieurs milligrammes d'hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina* ont été purifiés. Chaque lot (aliquots de 1mL) est analysé par FPLC sur colonne Superose 12-C (Pharmacia) afin de s'assurer de la pureté de l'échantillon (un pic unique). De même un spectre UV sur une plage de 400 nm à 700 nm est réalisé pour vérifier la fonctionnalité des hémoglobines de chaque lot (Figure 2). Trois maxima d'absorption sont observés à 414, 541 et 577 nm. Par comparaison, on rappelle que la méthémoglobine présente deux maxima à 500 et 635 nm.

Enfin, ces lots sont utilisés par la société Biotrial S.A. (Rennes, France) pour des tests précliniques réalisés sur des souris et des rats afin de tester les éventuelles réactions pathologiques et immunogènes.

Dissociation de l'hémoglobine extracellulaire de *Arenicola marina* en ces différentes sous-unités de base (Trimères, Dimères de linker et Monomères)

La dissociation de l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* (HbAm) doit être totale et conserver les sous-unités fonctionnelles. Les différentes sous-unités sont ensuite isolées et analysées par des techniques de chromatographie liquide (exclusion et échange d'ions), développées à cet effet.

1) Dissociation de l'HBL

1.1. Protocole de dissociation

Les études préliminaires de dissociation ont été développées à partir des publications de l'art antérieur (Vinogradov et al., 1979 ; Sharma et al., 1996 ; Mainwaring et al., 1986 ; Polidori et al., 1984 ; Kapp et al., 1984 ; Chiancone et al., 1972 ; Vinogradov et al., 1991 ; Krebs et al., 1996), c'est-à-dire en présence d'un réactif dissociant unique : urée, ions hétéopolytungstate, sels de guanidinium, SDS ou ions hydroxydes. Les agents utilisés agissent différemment sur la molécule :

- les ions hydroxydes (OH^-), le SDS, les sels de guanidinium et les ions hétéopolytungstate déstabilisent les ponts salins
 - l'urée déstabilise les interactions hydrophobes

Or, l'intérêt est d'obtenir le plus rapidement et le plus efficacement possible les quatre sous-unités de bases d'où l'idée d'associer les différents agents dissociants et en particulier le pH alcalin et l'urée. Après différents tests, il s'avère qu'une dissociation rapide et efficace est obtenue avec de l'urée 3M dilué dans le tampon de dissociation (0,1 M de base Trisma et 1mM d'EDTA) ajusté à pH 10 avec de la soude 2N. L'HbAm est ajustée à une concentration d'environ 4 mg/mL (solution mère). Toutes les analyses sont effectuées à +4°C et les échantillons sont conservés à l'obscurité le temps de l'étude. (Trisma = tris[hydroxyméthyl]aminométhane)

1.2. Analyses par chromatographie d'exclusion

Les conditions d'analyses sont détaillées dans le tableau 1 ci-dessous.

Système HPLC	HPLC Waters 626 LC System Superose 12-C (Pharmacia)	
Colonne	(gamme de séparation comprise entre 5×10^3 et 3×10^5 Da)	
Débit	0.5 mL/min	
Eluant	tampon pH 7,0 (tamponné par exemple avec de l'acide chlorhydrique concentré) et filtré sur filtre 0,22 µm (ou 0,45µm)	
Température de l'injecteur	+ 4°C	
	Echantillon	
	Suivi Analytique	Séparation et collecte
Volume injecté	20µL	200µL
Préparation des échantillons	Solution mère diluée à 1mg/mL dans le tampon de dissociation à pH10 et filtrée sur 0,45µm	Solution mère filtrée sur filtre 0,45µm

1.3. Analyses par échange d'ions

Le point isoélectrique (pHi) de l'HBL étant de 4,69 (Vinogradov, 1985), l'analyse par échange d'ions est réalisée sur une colonne anionique CIM DEAE disk (Interchim). En effet, l'HBL est chargée négativement pour un pH supérieur au pHi et est donc fixée sur une résine chargée positivement (résine DEAE). L'élution est effectuée grâce à la force ionique avec un gradient non linéaire de NaCl de 0 à 1 M (solution de NaCl de 1 M diluée dans le tampon de dissociation à pH 7,0 et filtrée sur 0,45 µm). Le tampon de dissociation à pH 7 est utilisé comme tampon d'élution. Le débit est de 4 mL/min.

1.4. Analyses par chromatographie en phase inverse

La chromatographie par phase inverse est effectuée sur une colonne de Symmetry 300 C₁₈ 5µm (4,6 × 250 mm) de chez Waters. En présence d'acétonitrile et de TFA (acide trifluoroacétique), HbAm se dissocie en ses sous unités de base (Trimère, Monomère et Linker) et l'hème se dissocie des globines. Ainsi, sans traitement préalable, HbAm est dissociée en tête de colonne. La méthode développée est décrite dans le tableau ci-dessous.

débit	1 mL/min		
Eluant A	H ₂ O MilliQ + 0.1% v/v HFBA		
Eluant B	ACN + 0.1% v/v HFBA		
Gradient			
	Temps en min	% A	% B
	0	58	42
	40	50	50
	41	48	52
	90	47	53
	95	5	95
	110	5	95

2) Résultats

2.1. Chromatographie d'exclusion

Le chromatogramme de l'HbAm dissociée en partie, est représenté figure 3. Cinq pics sont observés et il s'agit de les identifier. Les molécules sont éluées selon leur masse décroissante et l'HbAm native élue dans le volume mort (16 min). Les fractions correspondant à chaque pic sont analysées par SDS-PAGE (figure 4). Les résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous.

Fractions	Temps de rétention	Sous-unités
1	16 min 40	HbAm native
2	22 min 20	Dodécamère
3	25 min 30	Dimère de linker
4	26 min 40	Trimère
5	28 min 30	Monomères

2.2. Chromatographie ionique

Une fois la méthode développée (tableau 3), les fractions sont collectées, concentrées et analysées par gel SDS afin d'identifier chaque pic (Fig. 6 et tableau 4).

Une méthode est ensuite développée pour repurifier chaque sous-unité.

Temps en min	A : 1M NaCl dans B	B : Tampon de dissociation pH 7.0
0	5%	95 %
0,5	15%	85 %
1,5	15%	85 %
2,5	22%	78 %
3,5	22%	78 %
3,6	25%	75 %
5,5	25%	75 %
5,6	29%	71 %
6,5	29%	71 %
6,6	36%	64 %
7,0	36%	64 %
8,0	45%	55 %
8,1	100%	0 %
9,5	100%	0 %

TABLEAU 3 : Méthode développée pour l'analyse de l'HBL dissociée sur CIM-DEAE

fractions	Temps de rétention	Sous-unités
1	1 min 15	Monomères
2	2 min 40	Dimère de linker
3	3 min 10	Dimère de linker
4	4 min 40	Dodécamère
5	6 min 30	?
6	7 min 30	Trimère
7	8 min 50	HbAm

TABLEAU 4 : Association réalisée après analyse du gel (Figure 6) entre le temps de rétention et les sous-unités.

2.3. Chromatographie en phase inverse

Une fois la méthode développée, les fractions sont collectées, lyophilisées et analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier chaque pic.

fractions	Temps de rétention	Sous-unités
1	12 min	Linker
2	22 min	Linker
3	34 min	Monomère a1
4	38 min	Monomère a2
5	50 -70 min	Trimères

Les propriétés chimiques des trimères doivent être trop proches pour que l'on puisse les séparer par phase inverse. Ainsi, seuls les deux linkers et les monomères a1 et a2 ont pu être isolés.

2.4. Dissociation de l'HbAm

La cinétique de dissociation est suivie par chromatographie d'exclusion. L'intégration des chromatogrammes par le logiciel Millénium (Waters), permet le calcul du pourcentage des différents composés à partir de l'aire sous courbe. L'évolution de la cinétique de dissociation est représentée figures 7, 8 et 9.

Les trois graphiques des Figures 7, 8 et 9 montrent bien l'intérêt d'associer les deux agents dissociants (urée 3M et OH⁻) pour obtenir efficacement les trois sous-unités de base en 24h.

Réassocation de l'hémoglobine

1) Matériels et méthodes

Les expériences de réassocation sont effectuées sur l'HbAm dissociée selon les protocoles cités plus haut (pH9, pH10, Urée 3M, Urée 4M, Urée 3M à pH10). Différents tampons de réassocation sont testés afin d'obtenir une réassocation optimale. Le changement de tampon (tampon de dissociation → tampon de réassocation) est effectué de deux façons différentes :

- L'HbAm dissociée est lavée 4 fois contre 4 mL de tampon de réassocation sur Centricon-10 (Millipore) à +4°C ;

- L'HbAm dissociée est dialysée 24 h contre de l'eau MilliQ (Millipore) ($2 \times 2L$) puis 48 h contre le tampon de réassocation ($3 \times 2L$) à +4°C.

2) Résultats

D'après des résultats ultérieurs sur les hémoglobines extracellulaires d'Annélides (Mainwaring et al., 1986 ; Polidori et al., 1984), la présence d'ions divalents tels que Ca²⁺ et Mg²⁺ est nécessaire au maintien de la structure quaternaire de l'hémoglobine. En effet, ils la stabilisent et ralentissent le phénomène de dissociation (Sharma et al., 1996). Ces ions forment un complexe avec les groupes carboxylates des chaînes latérales et carbonyles des chaînes principales. La présence d'ions divalents peut avoir un effet sur la réassocation lorsque les groupements carboxyliques sont ionisés, donc entre autre lorsque la dissociation a eu lieu à pH alcalin. Il est donc important que le tampon de réassocation contienne du calcium et/ou du magnésium. Ceci explique aussi la présence d'EDTA dans le tampon de dissociation ; EDTA qui chélate ces ions divalents. Le tampon actuellement mis au point est constitué de 0,1 M de base Trisma, 400 mM de NaCl, 2,95 mM KCl, 32 mM MgSO₄, 11 mM CaCl₂ ajusté à pH 7 avec de l'HCl concentré. La réassocation est suivie selon le même principe que la dissociation (Figures 10 et 11).

Une réassocation est observée si la dissociation est de courte durée de l'ordre de la minute. Cette réassocation correspond à un réarrangement d'intermédiaires de dissociation qui sont des hémoglobines tronquées (HBL dissociée de 1 à plusieurs douzièmes).

Réduction de l'HbAm pour l'étude des différentes chaînes polypeptidiques

1) Réduction de l'hémoglobine préalable à la séparation par chromatographie liquide par phase inverse

L'HbAm (4 mg/mL) est réduite dans 10% de DTT (dithiothréitol) dissous dans un tampon de dissociation à pH 8-9 (0,1 M trisma ou 10 mM bicarbonate d'ammonium) pendant 30 minutes à température ambiante. Une fois réduites, les chaînes protéiques obtenues sont alkylées en présence de 100mM iodoacétamide dissout dans un tampon de dissociation à pH 8-9 pendant 30 minutes à température ambiante.

On peut éventuellement également envisager le protocole suivant : L'HbAm (4 mg/mL) est réduite dans 100 mM de DTT (dithiothréitol) dissout dans le tampon de dissociation à pH 8-9 pendant 1 h à 40°C. Dans ces conditions drastiques, seules les

globines pourront être analysées. En effet, les linkers (protéines non-globines) sont riches en cystéines et sont donc détériorés. Une fois réduite, l'HbAm est lavée 4 fois sur Amicon 30 000Da (Millipore) dont seul le filtrat est récupéré (tout ce qui est de poids inférieur à 30 000 Da). Le filtrat est ensuite lavé sur Amicon 10 000Da pour éliminer tout ce qui est inférieur à 10 000 Da. Ainsi, seuls les monomères compris entre 30 000 Da et 10 000 Da sont contenus dans l'échantillon (gamme de poids des chaînes de globines qui constituent l'HbAm).

2) Séparation des chaînes protéiques par chromatographie de phase inverse

2.1. Matériels et méthodes

La chromatographie par phase inverse est effectuée sur une colonne de Symmetry 300 C₁₈ 5µm (4,6 × 250 mm) de chez Waters. La méthode développée est décrite dans le tableau ci-dessous et le chromatogramme obtenu est représenté figure 12.

débit	1 mL/min		
Eluant A	H ₂ O MilliQ + 0.1% v/v HFBA		
Eluant B	ACN + 0.1% v/v HFBA		
Gradient			
	Temps en min	% A	% B
	0	75	25
	2	58	42
	10	58	42
	40	40	60
	45	0	100
	55	0	100

On peut éventuellement également envisager le protocole suivant.

débit	1 mL/min	
Eluant A	H ₂ O MilliQ + 0.1% v/v TFA	
Eluant B	ACN + 0.1% v/v TFA	
Gradient		
Temps en min	% A	% B
0	80	20
0,25	60	40
4,0	55	45
10,0	55	45
10,05	0	100
16,0	0	100

Chaque chaîne protéique (mises en évidence par un pic unique à 280nm) est collectée puis lyophilisée et stockée à -40°C jusqu'aux prochaines analyses. Ainsi, il a

été possible de séparer les 5 monomères suivants : a_1 (~15952 kDa), a_2 (~15975 kDa), d_2 (~17033 kDa), b_2 (~16020 kDa) et c (~16664 kDa).

3) Séparation des chaînes protéiques par gel bidimensionnel

Le gel bidimensionnel qui est une combinaison des techniques d'isoélectrofocalisation en première dimension et de SDS-PAGE en seconde dimension permet de séparer un mélange complexe de protéine.

Electrofocalisation

Après purification par FPLC, l'hémoglobine de *Arenicola* est dialysée et lyophilisée. 500 µg sont repris dans un tampon de réhydratation. Ce tampon contient du Chaps (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate ; Sigma) à 4%, 1% de DTT fraîchement préparé, cocktail d'inhibiteurs de protéase (Bohringer), 50 µg/ml de TLCK (inhibiteur de la trypsine), 1 µl de Bleu de Bromophénol à 1%.

Le mélange est soniqué et centrifugé pour éliminer le matériel non dissous. On dépose ensuite de l'huile de roche aux deux extrémités du support de la bande d'électrofocalisation, et on dépose ensuite l'échantillon au milieu. La bande de 17 cm est ensuite déposée sur l'échantillon en éliminant toute bulle d'air. La bande est alors recouverte d'huile de roche pour éviter l'évaporation de l'échantillon.

Une réhydratation active est alors réalisée à 50V (20°C durant 12 heures). Ensuite nous procédons à la focalisation durant deux jours.

La bande sera ensuite récupérée et placée sur un gel d'acrylamide 6-18%, notamment à 10%, de largeur 18 cm, de longueur 20 cm et d'épaisseur 1 mm. La migration est effectuée en enceinte réfrigérée à 10°C, pendant 14 heures à 400 V, 25 mA et 100 W.

La séparation des chaînes protéiques sera alors réalisée en fonction de leur taille après avoir scellé la bande en haut du gel à l'aide d'une solution d'agarose à 1%. Une fois séparées, les bandes protéiques sont révélées sur gel par coloration au bleu de Coomassie (Coomassie® G250).

Construction du gel en gradient

Vingt-cinq ml de solution dense à 18% de polyacrylamide (acrylamide 2,5 M ; Tris 0,4 M ; Glycérol 30% (v/v) ; dodécyl sulfate de sodium (SDS) 3,5 mM ; TEMED (N,N,N',N' -tétraméthyléthylénediamine ; Sigma) 0,05% (v/v) ; persulfate de sodium

1,6 mM) sont placés dans la chambre de mélange sous agitation constante tandis qu'un même volume de solution légère à 6% de polyacrylamide (acrylamide 0,8 M ; Tris 0,4 M ; SDS 3,5 mM ; TEMED 0,06% (v/v) ; persulfate de sodium 2,4 mM) est placé dans l'autre chambre. Le haut du gel est recouvert d'une solution d'isobutanol saturée en eau bidistillée. Le gel est ensuite laissé 1 h à polymériser à température ambiante puis le haut du gel est rincé plusieurs fois avec de l'eau bidistillée et l'ensemble est placé une nuit à 10°C. Après avoir enlevé l'eau résiduelle à l'aide d'un papier absorbant, la solution de gel de concentration (acrylamide 0,56 M ; méthylène bis-acrylamide 6,9 mM ; Tris 124 mM ; SDS 3,5 mM ; TEMED 0,05% (v/v) ; persulfate de sodium 2,2 mM) est coulée sur le gel de séparation et une cale permettant de former l'empreinte de la bande est introduite dans la solution gel de concentration. La polymérisation est complète après 1 h à température ambiante.

4) Analyse par micro séquençage des chaînes protéiques isolées par phase inverse et gel bidimensionnel

Les chaînes protéiques isolées par chromatographie en phase inverse et par gel bidimensionnel sont ensuite digérées et analysées par spectrométrie de masse LC-MS/MS sur un appareil de type ESI-Q-TOF.

Digestion des protéines séparées par chromatographie en phase inverse.

Chaque chaîne protéique isolée est soumise à une digestion enzymatique, étape essentielle avant leur analyse par microséquençage. Les chaînes protéiques lyophilisées sont dissoutes dans une solution eau milliQ, acetonitrile contenant l'endoprotéase ; la trypsin qui hydrolyse au niveau C-terminal de la lysine et de l'arginine, donnant généralement des peptides de masses comprises entre 500 et 2500 Da, pendant au minimum 3h à température ambiante.

Digestion des protéines séparées sur gel bidimensionnel

Chaque spot du gel est découpé pour être soumis à une digestion enzymatique. Cette étape de digestion enzymatique est essentielle. Elle consiste à hydrolyser les protéines de façon spécifique, à l'aide d'une enzyme, en plusieurs peptides.

Avant de débuter la digestion, des étapes de décoloration, de réduction et d'alkylation sont indispensables :

- les lavages successifs à l'hydrogénocarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) et à l'acétonitrile (ACN) permettent d'éliminer l'agent de coloration présent dans le morceau de gel,

- les réactions de réduction au dithiothréitol (DTT) et d'alkylation à l'iodoacétamide permettent l'ouverture puis le blocage des ponts disulfures formés entre deux cystéines présentes dans la séquence de la protéine et des liaisons cystéine-acrylamide.

La dernière étape de la méthode consiste à extraire du gel les peptides trypsiques à l'aide d'une solution d'extraction, composée d'acétonitrile et d'eau, additionnée d'un peu d'acide.

Analyse par nanoLC-MS-MS

Les peptides extraits sont ensuite transférés vers la plaque PCR. Ce transfert se fait en deux fois 15 μL , pour récupérer la totalité du volume. Pour éliminer l'acétonitrile, qui pourrait gêner la rétention des peptides sur la pré-colonne, un temps d'évaporation (pause) de 2 heures est appliqué avant l'analyse par nanoLC-MS-MS.

Résultats

Ceci a permis l'obtention de quelques centaines de micoséquences correspondant à chaque chaîne protéique séparée par gel 2D.

5) Analyse par séquençage d'Edman des chaînes protéiques isolées par chromatographie en phase inverse

Principe

En présence de tampon N-méthyl pipéridine, le Phényl-Iso-Thio-Cyanate (PTC) se couple aux fonctions amines primaires et secondaires des protéines (PTC-Protéine). Le temps de réaction à 45°C est de 18 minutes. La liaison peptidique suivante est fragilisée, ce qui permet sa coupure en 3 minutes par l'acide trifluoracétique (TFA) pur générant ainsi l'anilino-thiazolinone (ATZ) du premier acide aminé (AA) et la protéine ayant perdu le 1er AA.

L'ATZ-AA est extrait du milieu réactionnel et converti en milieu acide (TFA à 25 % dans l'eau) en phényl thio-hydantoïne (PTH-AA) plus stable. Le PTH-AA peut donc

être analysé par HPLC et sa nature déterminée grâce à un étalon de PTH-AAs. Le cycle de réaction peut être répété et conduit ainsi à la séquence de la protéine. Edman a automatisé la réaction qui porte son nom en créant en 1967 le premier séquenceur de protéine. L'appareil est couplé à une HPLC dans laquelle il injecte le PTH-AA. Par comparaison avec un spectre étalon, il est alors possible d'identifier l'acide aminé d'origine et d'obtenir sa quantification. Le tout est sous le contrôle d'un ordinateur qui pilote les différents éléments et assure l'acquisition de données ainsi que leur traitement.

Résultats

Ainsi, il a été possible d'obtenir environ 30 acides aminés des extrémités N-terminales de 5 monomères et d'un linker isolés par phase inverse.

Détails des protocoles d'amplification par PCR et présentation des séquences nucléotidiques et polypeptidiques des globines des sous-familles A1, A2a, A2b, B2 et B1 et du linker L1 du polychète marin *Arenicola marina*

Les amplifications par PCR des 5 globines A1, A2a, A2b, B1 et B2, ainsi que du linker L1, dont les séquences nucléotidiques sont présentées ci-dessous, ont débuté par la conception d'amorces dégénérées spécifiques (sens et antisens) des sous-familles A1, A2, B1 et B2. Ces amorces, qui ont permis l'amplification des cinq globines susmentionnées (A1, A2a, A2b, B1 et B2) puis le clonage et le séquençage des produits de PCR correspondants, ont été conçues à partir d'alignements de séquences protéiques de globines d'annélides disponibles dans les banques de données.

Les matrices d'ADN complémentaires utilisées pour les réactions de PCR ont été synthétisées à partir d'ARN messagers purifiés à partir d'ARN totaux extraits sur des Arénicoles, en raison de la petite taille des organismes et de leur rythme intense de croissance traduisant des niveaux importants d'expression des gènes, dont ceux impliqués dans la synthèse de l'hémoglobine. Les ADN complémentaires ont ainsi été synthétisés. Ces étapes ont fait appel à des kits commerciaux de biologie moléculaire de chez Ambion (purification des ARNs), Amersham (purification des ARNm), Promega (RT), Invitrogen (clonage), Abgene (séquençage).

Dans un second temps, nous avons mis au point les réactions de PCR, notamment en ce qui concerne la détermination des paramètres de temps de dénaturation, de temps et de température d'hybridation et de temps d'elongation. Les concentrations en MgCl₂ ont également été optimisées.

Enfin, dans une dernière étape, des expériences de 5' et 3' RACE PCR ont été effectuées de façon à obtenir les séquences codantes complètes. Ces étapes ont fait appel au kit de biologie moléculaire de chez Roche.

Sont présentées ci-dessous, les séquences nucléotidiques des amores dégénérées sens et antisens, les paramètres des PCR et les séquences codantes partielles ou complètes pour chacune des globines A2a, A2b, A1, B1 et B2, et pour le linker L1.

On précise que l'analyse totale de ces séquences par un blast dans les banques de données donne des valeurs comprises entre $2.10^{-3} < \text{Evalue} < 5^{e-31}$.

Globine A2a

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la globine A2a (SEQ ID NO : 2), on utilise le couple d'amores (SEQ ID NO : 19 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

Temps et température initiale de dénaturation :	4 min à 95°C
Temps et Température de dénaturation :	30 s à 95°C
Temps et Température d'hybridation :	30 s à 56°C
Temps et Température d'elongation :	40 s à 72°C
Temps et Température d'elongation finale :	10 min à 72°C

35 cycles

Réaction de PCR :

Par réaction : 5-20 ng ADNc
100 ng amorce sens
100 ng amorce antisens
dNTP 200 μM final
MgCl₂ 2mM final
Tampon PCR 1X final
1 unité Taq Polymérase
Qsp 25 μL H₂O

Globine A2b

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 codant pour la globine A2b (SEQ ID NO : 4), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 21 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

PCR : 4 min à 95°C
 30 s à 95°C
 30 s à 52°C }
 40 s à 72°C } 35 cycles
 10 min à 72°C

Globine A1

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5 codant pour la globine A1 (SEQ ID NO : 6), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 22 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

PCR : 4 min à 95°C
 1 min à 95°C
 1 min à 50°C }
 1 min 30 à 72°C } 35 cycles
 10 min à 72°C

Globine B2

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7 codant pour la globine B2 (SEQ ID NO : 8), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 23 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

PCR : 4 min à 95°C
 30 s à 95°C
 40 s à 52°C }
 30 s à 72°C } 35 cycles
 10 min à 72°C

Globine B1

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9 codant pour la globine B1 (SEQ ID NO : 10), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 24 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

PCR: 4 min à 95°C

30 s à 95°C
40 s à 52°C
30 s à 72°C

} 35 cycles

10 min à 72°C

Linker L1

Pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11 codant pour le Linker L1 (SEQ ID NO : 12), on utilise le couple d'amorces (SEQ ID NO : 25 ; SEQ ID NO : 20).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

PCR : 4 min à 95°C

40 s à 95°C
1min s à 58°C
1min s à 72°C

} 35 cycles

10 min à 72°C

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bunn, H.F. et Jandl, J.H. (1968) *Trans Assoc Am Physicians*, **81**, 147,
- Chang, T.M.S. (1957) Hemoglobin Corpuscles, McGill University,
- Chang, T.M.S. (1964) *Science*, **146**, 524-525,
- Chang, T.M.S. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **44**, 1531-1533,
- Chang, T.M.S. (1997) Blood substitutes: principales, methods, products and clinical trials, Vol. I, Karger, Basel, Suisse,
- Chiancone, E., et al. (1972) Studies on erythrocytoxin. II. Dissociation of earthworm erythrocytoxin, *J Mol Biol*, **70**(1): 73-84,
- Clark, L.C.J. et Gollan, F. (1966) *Science*, **152**, 1755,
- De Haas, F.; Boisset, N.; Taveau, J.C.; Lambert, O.; Vinogradov, S.N. et Lamy, J.N. (1996) *Biophys. J.*, **70**, 1973-1984,
- De Haas, F.; Taveau, J.-C.; Boisset, N.; Lambert, O.; Vinogradov, S.N. et Lamy, J.N. (1996) *J. Mol. Biol.*, **255**, 140-153,
- De Haas, F.; Zal, F.; Lallier, F.H.; Toulmond, A. et Lamy, J.N. (1996) Proteins-structure fonction and genetics, **3**, 241-256,
- De Haas, F.; Zal, F.; You, V.; Lallier, F.H.; Toulmond, A. et Lamy, J.N. (1996) *J. Mol. Biol.*, **264**, 111-120,
- Dickerson, R.E. et Geis, I. (1983) Hemoglobin: Structure, function, evolution, and pathology, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA,
- Geyer, R.P.; Monroe, R.G. et Taylor, K. (1968) Survival of rats totally perfused with a fluorocarbon-detergent preparation, J.C. Norman, J. Folkman, W.G. Hardisson, L.E. Rudolf et F.J. Veith (Eds), 85-96, Appleton Century Crofts, New York,
- Goodin, T.H.; Grossbard, E.B.; Kaufman, R.J.; Richard, T.J.; Kolata, R.J.; Allen, J.S. et Layton, T.E. (1994), *Crit Care Med*, **22**, 680-689,
- Hirsch, R.E.; Jelicks, L.A.; Wittenberg, B.A.; Kaul, D.K.; Shear, H.L. et Harrington, J.P. (1997) Artificial Cells, Blood Substitutes & Immobilization Biotechnology, **25**, 429-444,
- Jia, L.; Bonaventura, C.; Bonaventura, J. et Stamler, J.S. (1996) *Nature*, **380**, 221-226,
- Kapp, O.H. et Crewe, A.V. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **789**, 294-301,

- Kapp, O.H., et al. (1984) The reassociation of *Lumbricus terrestris* hemoglobin dissociated at alkaline pH, *J Biol Chem*, **259**(1): 628-39,
- Krebs, A., et al. (1996) Molecular shape, dissociation, and oxygen binding of the dodecamer subunit of *Lumbricus terrestris* hemoglobin, *J Biol Chem*, **271**(31): 18695-704,
- Lamy, J.N.; Green, B.N.; Toulmond, A.; Wall, J.S.; Weber, R.E. et Vinogradov, S.N. (1996), *Chem. Rev.* **96**, 3113-3124
- Levin, O. (1963) *J. Mol. Biol.*, **6**, 95-101,
- Mainwaring, M.G., et al. (1986) The dissociation of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris* at acid pH and its reassociation at neutral pH. A new model of its quaternary structure, *J Biol Chem*, **261**(23): 10899-908,
- Mitsuno, T. et Naito, R. (1979) Perfluorochemical Blood Substitutes, Excerpta Medica, Amsterdam,
- Mitsuno, T. et Ohyanagi, H. (1985) Present status of clinical studies of fluosol-DA (20%) in Japan, K.K. Tremper (Ed), 169-184, Little Brown & Co, Boston,
- Naito, R. et Y. K. (1978) An improved perfluorodecalin emulsion. In Blood Substitutes and Plasma Expanders, G.A. Jamieson and T.J. Greenwalt (Eds), 81, Alan R. Liss Inc., New York,
- Nho, K.; Glower, D.; Bredehoeft, S.; Shankar, H.; Shorr, R. et Abuchowski, A. (1992) Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology, An International Journal, **20**, 511-524,
- Payne, J.W. (1973) *Biochem J.* **135**, 866-873,
- Polidori, G., et al. (1984) The dissociation of the extracellular hemoglobin of *Tubifex tubifex* at extremes of pH and its reassociation upon return to neutrality, *Arch Biochem Biophys*, **233**(2): 800-14,
- Reiss, J.G. (1991) *Vox Sang*, **61**, 225-239,
- Reiss, J.G., (1994) Artificial Cells, Blood substitutes & Immobilization Biotechnology, An International Journal **22**, 945-1511,
- Roche, J. (1965) Electron microscope studies on high molecular weight erythrocytins (invertebrate hemoglobins) and chlorocruorins of annelids, D.A. Munday (Ed), 62-80, Pergamon Press, Oxford,
- Roche, J.; Bessis, M. et Thiery, J.P. (1960) *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 182-184,
- Roche, J.; Bessis, M.T. et Thiery, J.P. (1960) *C. R. Soc. Biol.* **154**, 73-80,

- Sharma, P.K., et al. (1996) The role of the dodecamer subunit in the dissociation and reassembly of the hexagonal bilayer structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin, *J Biol Chem*, **271**(15): 8754-62,
- Sloviter, H. et Kamimoto, T. (1967) *Nature*, **216**, 458,
- Terwilliger, N.B. (1992) Molecular Structure of the extracellular heme proteins., Vol. 13, C.P. Mangum (Ed), 193-229, Springer-Verlag, Berlin,
- Van Bruggen, E.F.J. et Weber, R.E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **359**, 210-212,
- Vinogradov, S.N., et al. (1991) A dodecamer of globin chains is the principal functional subunit of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*, *J Biol Chem*, **266**(20): 13091-6,
 - Vinogradov, S.N., Shlom J. M. et Doyle, M. (1979) Dissociation of the extracellular hemoglobin of *Arenicola cristata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**: 145-150,
 - Vinogradov, S.N. (1985) The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocruorins and chlorocruorins), *Comp Biochem Physiol B*, **82**(1): 1-15,
 - Zal, F.; Green, B.N.; Lallier, F.H.; Vinogradov, S.N. et Toulmond, A. (1997) *Eur. J. Biochem.*, **243**, 85-92.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*,
ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina* avec au moins un agent dissociant, et le cas échéant un agent réducteur, notamment un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptopropanol et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le tampon de dissociation comprend un agent tamponnant à une concentration comprise d'environ 0,05 M à environ 0,1 M, notamment du Trisma (tris[hydroxyméthyl]aminométhane) et 0 à 10 mM d'EDTA ajusté à un pH compris d'environ 5 à environ 12, et de préférence d'environ 7,5 à 12.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les chaînes protéiques constituant ladite molécule sont obtenues par la réduction de quatre sous-unités par un agent réducteur, par exemple en présence de DTT, lesdites sous-unités étant elles-mêmes obtenues par mise en présence d'un échantillon d'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* avec différents agents dissociants, notamment un tampon de dissociation.

4. Procédé de préparation de couples d'amorces à partir des chaînes protéiques telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini dans l'une des revendications 1 à 3, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- l'isolement de chacune des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini selon l'une des revendications 1 à 3,
- le microséquençage par spectrométrie de masse et par séquençage d'Edman de chacune des chaînes protéiques isolées susmentionnées, afin d'obtenir une

microséquence correspondant à chacune des séquences constituées de 5 à 20 acides aminés, et

- la détermination de couples d'amorces dégénérées à partir des microséquences susmentionnées.

5. Couples d'amorces tels qu'obtenus selon le procédé de la revendication 4, lesdits couples étant notamment les suivants :

- a) *Amorce sens* : GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG (SEQ ID NO : 21)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- b) *Amorce sens* : TGY GGN ATH CTN CAR CG (SEQ ID NO : 23)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- c) *Amorce sens* : AAR GTI AAR CAN AAC TGG (SEQ ID NO : 24)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- d) *Amorce sens* : TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG (SEQ ID NO : 25)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- e) *Amorce sens* : AAR GTN ATH TTY GGN AGR GA (SEQ ID NO : 26)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)
- f) *Amorce sens* : GAR CAY CAR TGY GGN GGN GA (SEQ ID NO : 27)
Amorce antisens : CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT (SEQ ID NO : 22)

où :

R représente A ou G,

Y représente C ou T,

N représente A, G, C ou T,

I représente l'inosine,

H représente A, C ou T

6. Procédé de préparation de séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, à partir des amorces telles qu'obtenues selon le procédé de la revendication 4, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il correspond à un procédé d'amplification en chaîne par

polymérase (PCR), comprenant une répétition d'au moins 30 fois du cycle constitué par les étapes suivantes :

- * la dénaturation, par chauffage, de l'ADNc monocaténaire codant pour une des chaînes protéiques constituant la molécule d'hémoglobine d'*Arenicola marina*, de façon à dénaturer d'éventuelles structures secondaires et des reliquats d'ARN, ledit ADNc étant obtenu à partir d'ARNm, cette étape permettant d'obtenir des brins d'ADNc monocaténaires dénaturés,
- * l'hybridation des couples d'amorces tels qu'obtenus par le procédé tel que défini ci-dessus aux brins d'ADNc monocaténaires dénaturés susmentionnés à une température adéquate, pour obtenir des amorces hybridées, et
- * la synthèse du brin complémentaire de l'ADNc par une polymérase à une température adéquate, à partir des amorces hybridées telles qu'obtenues à l'étape précédente.

7. Procédé de préparation selon la revendication 6, caractérisé en ce que :

- la première étape dudit procédé est une étape de dénaturation d'environ 10 secondes à environ 5 minutes à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,
- le cycle, répété environ 30 à 40 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation d'environ 10 secondes à environ 5 minutes, à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,
 - * une étape d'hybridation d'environ 20 secondes à environ 2 minutes, à une température comprise d'environ 50°C à environ 60°C, et de préférence d'environ 50°C à environ 56°C,
 - * une étape d'elongation d'environ 20 secondes à environ 1 minute et 30 secondes, à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation d'environ 5 minutes à environ 15 minutes à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C.

8. Procédé de préparation selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que les couples d'amorces utilisés sont tels que définis dans la revendication 5.

9. Procédé de préparation selon la revendication 8, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (GAR TGY GGN CCN TTR CAR CG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, Y et N étant tels que définis dans la revendication 5, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
 - le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 30 secondes à une température égale à 56°C,
 - * une étape d'elongation de 40 secondes à une température égale à 72°C, et
 - la dernière étape du procédé est une étape d'elongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,
 - afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 13,
- ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1.

10. Procédé de préparation selon la revendication 8, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (TGY GGN ATH CTN CAR CG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), N, Y et R étant tels que définis dans la revendication 5, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
 - le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 30 secondes à une température égale à 53°C,
 - * une étape d'elongation de 40 secondes à une température égale à 72°C, et
 - la dernière étape du procédé est une étape d'elongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,
 - afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15,
- ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3.

11. Procédé de préparation selon la revendication 8, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (AAR GTI AAR CAN AAC TGG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, I et N étant tels que définis dans la revendication 5, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 1 minute à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 1 minute à une température égale à 50°C,
 - * une étape d'elongation de 1 minute et 30 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,
afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 17,
ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5.

12. Procédé de préparation selon la revendication 8, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (TGY TGY AGY ATH GAR GAY CG ; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), Y, H et R étant tels que définis dans la revendication 5, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 40 secondes à une température égale à 52°C,
 - * une étape d'elongation de 30 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'elongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,
afin d'obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 19,
ledit procédé comprenant éventuellement une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7.

13. Procédé de préparation selon la revendication 8, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (AAR GTN ATH TTY GGN AGR GA; CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, H, N et Y étant tels que définis dans la revendication 5,

ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 30 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 40 secondes à une température égale à 52°C,
 - * une étape d'élongation de 30 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'élongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,
afin d'obtenir une séquence nucléotidique partielle de référence,
ledit procédé comprenant une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9.

14. Procédé de préparation selon la revendication 8, caractérisé en ce que le couple d'amorces utilisé est le suivant : (GAR CAY CAR TGY GGN GGN GA, CTC CTC TCC TCT CCT CTT CCT), R, N et Y étant tels que définis dans la revendication 5,

ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la première étape du procédé est une étape de dénaturation de 4 minutes à une température égale à 95°C,
- le cycle, répété 35 fois, comprend les étapes suivantes :
 - * une étape de dénaturation de 40 secondes à une température égale à 95°C,
 - * une étape d'hybridation de 1 minute à une température égale à 58°C,
 - * une étape d'élongation de 1 minute et 10 secondes à une température égale à 72°C, et
- la dernière étape du procédé est une étape d'élongation de 10 minutes à une température égale à 72°C,
afin d'obtenir une séquence nucléotidique partielle de référence,
ledit procédé comprenant une étape supplémentaire de 5' RACE PCR pour obtenir la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11.

15. Protéines codées par l'une des séquences telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 6 à 14.

16. Protéine selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 2,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,
- ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, avec la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,
- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 2.

17. Protéine selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 4,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 4 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,
- ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 4 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, avec la séquence SEQ ID NO : 4, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,
- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 4.

18. Protéine selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 6,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 6 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,
- ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 6 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, avec la séquence SEQ ID NO : 6, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,
- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 6.

19. Protéine selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 8,
- ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 8 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,
- ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 8 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, avec la séquence SEQ ID NO : 8, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,
- ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 8.

20. Protéine selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

– la séquence SEQ ID NO : 10,

– ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 10 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette le transport de l'oxygène,

– ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 10 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, avec la séquence SEQ ID NO : 10, sous réserve que ladite séquence homologue permette le transport de l'oxygène,

– ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette le transport de l'oxygène, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 160 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 10.

21. Protéine selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

– la séquence SEQ ID NO : 12,

– ou toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 12 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que ladite séquence dérivée permette l'association des chaînes de globines entre elles,

– ou toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 12 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 75%, avec la séquence SEQ ID NO : 12, sous réserve que ladite séquence homologue permette l'association des chaînes de globines entre elles,

– ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve que ledit fragment permette l'association des chaînes de globines entre elles, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 60 acides aminés, et notamment d'au moins environ 280 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 12.

22. Séquences nucléotidiques telles qu'obtenues selon le procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 6 à 14.

23. Séquences nucléotidiques codant pour une protéine telle que définie dans l'une des revendications 15 à 21.

24. Séquence nucléotidique selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour SEQ ID NO : 2,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 1, et codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 2,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 1 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 2,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 1, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 1,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

25. Séquence nucléotidique selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 codant pour SEQ ID NO : 4,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 3, et codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 4,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 4,

- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 3, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 3,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

26. Séquence nucléotidique selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5 codant pour SEQ ID NO : 6,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 5, et codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 6,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 5 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 6,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 5, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 5,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

27. Séquence nucléotidique selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7 codant pour SEQ ID NO : 8,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 7, et codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 8,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 7 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 8,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 7, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 7,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

28. Séquence nucléotidique selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9 codant pour SEQ ID NO : 10,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 9, et codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 10,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 9 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 10,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 9, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 9,

- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 480 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

29. Séquence nucléotidique selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11 codant pour SEQ ID NO : 12,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 11, et codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 12,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 11 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 12,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 11, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence SEQ ID NO : 11,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 180 nucléotides, et notamment d'au moins environ 800 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

30. Procédé de préparation selon la revendication 6, de séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques constituant la molécule

d'hémoglobine d'Annélides, notamment d'*Arenicola marina*, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

– une étape de mise en présence de la molécule d'hémoglobine susmentionnée avec au moins un agent dissociant et un agent réducteur, notamment un mélange constitué de dithiothréitol (DTT) ou de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ou de bêta-mercaptopropanoïde et d'un tampon de dissociation, pendant un temps suffisant pour séparer les chaînes protéiques les unes des autres,

permettant la dissociation, puis la réduction, de ladite molécule d'hémoglobine, afin d'obtenir les chaînes protéiques constituant ladite molécule,

– l'isolement de chacune des chaînes protéiques susmentionnées,

– le microséquençage par spectrométrie de masse et le séquençage d'Edman de chacune des chaînes protéiques isolées susmentionnées, afin d'obtenir une microséquence correspondant à chacune des séquences constituées de 5 à 20 acides aminés,

– la détermination des couples d'amorces dégénérées à partir des microséquences susmentionnées,

– la préparation des séquences nucléotidiques codant pour les chaînes protéiques susmentionnées, à partir des amorces telles qu'obtenues précédemment, par un procédé d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), comprenant les étapes suivantes :

– la première étape dudit procédé est une étape de dénaturation d'environ 10 secondes à environ 5 minutes à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,

– le cycle, répété environ 30 à 40 fois, comprend les étapes suivantes :

* une étape de dénaturation d'environ 10 secondes à environ 5 minutes, à une température comprise d'environ 90°C à environ 110°C,

* une étape d'hybridation d'environ 20 secondes à environ 2 minutes, à une température comprise d'environ 50°C à environ 56°C,

* une étape d'elongation d'environ 20 secondes à environ 1 minute et 30 secondes, à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C, et

– la dernière étape du procédé est une étape d'elongation d'environ 5 minutes à environ 15 minutes à une température comprise d'environ 70°C à environ 75°C.

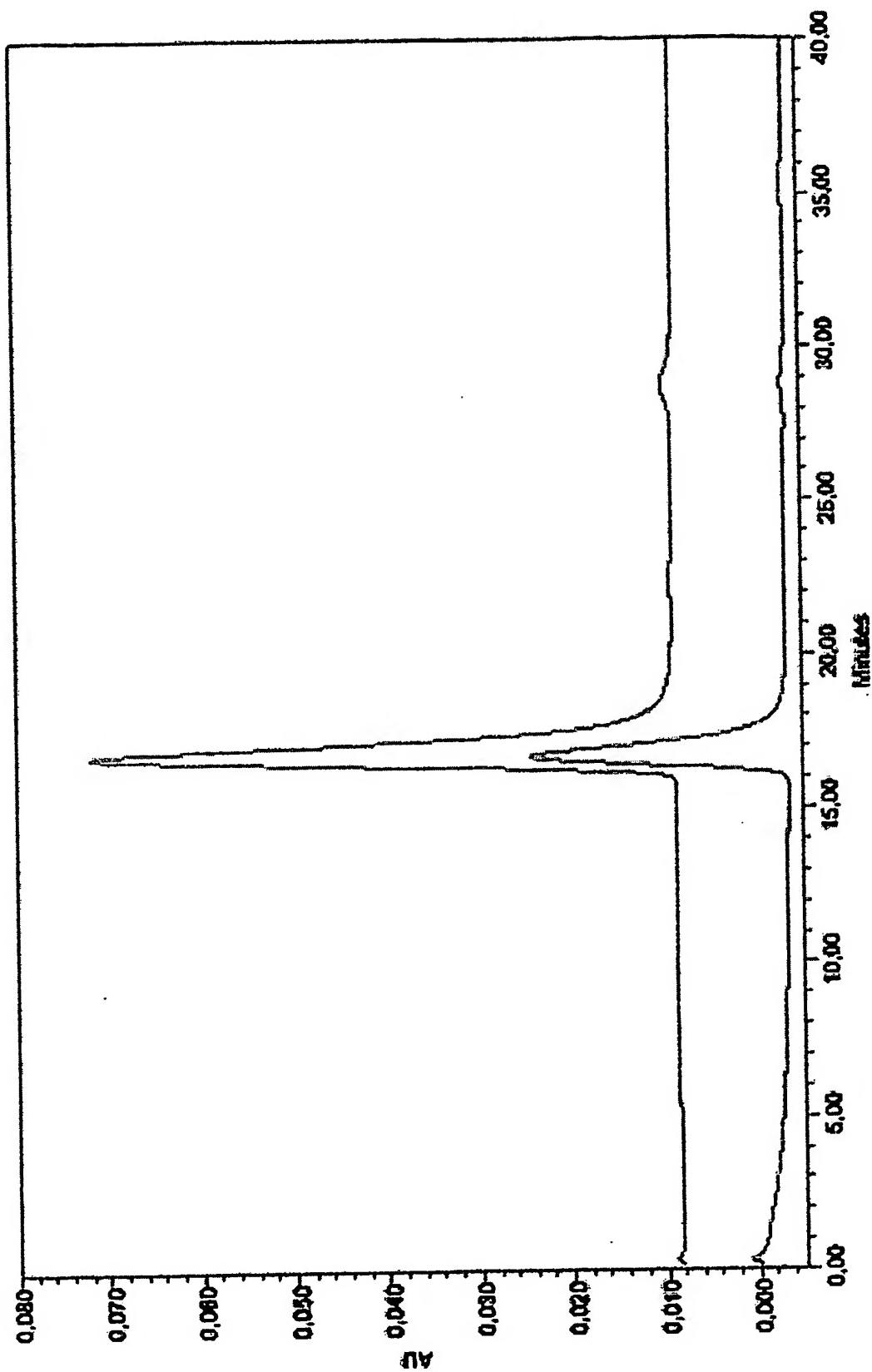


FIGURE 1

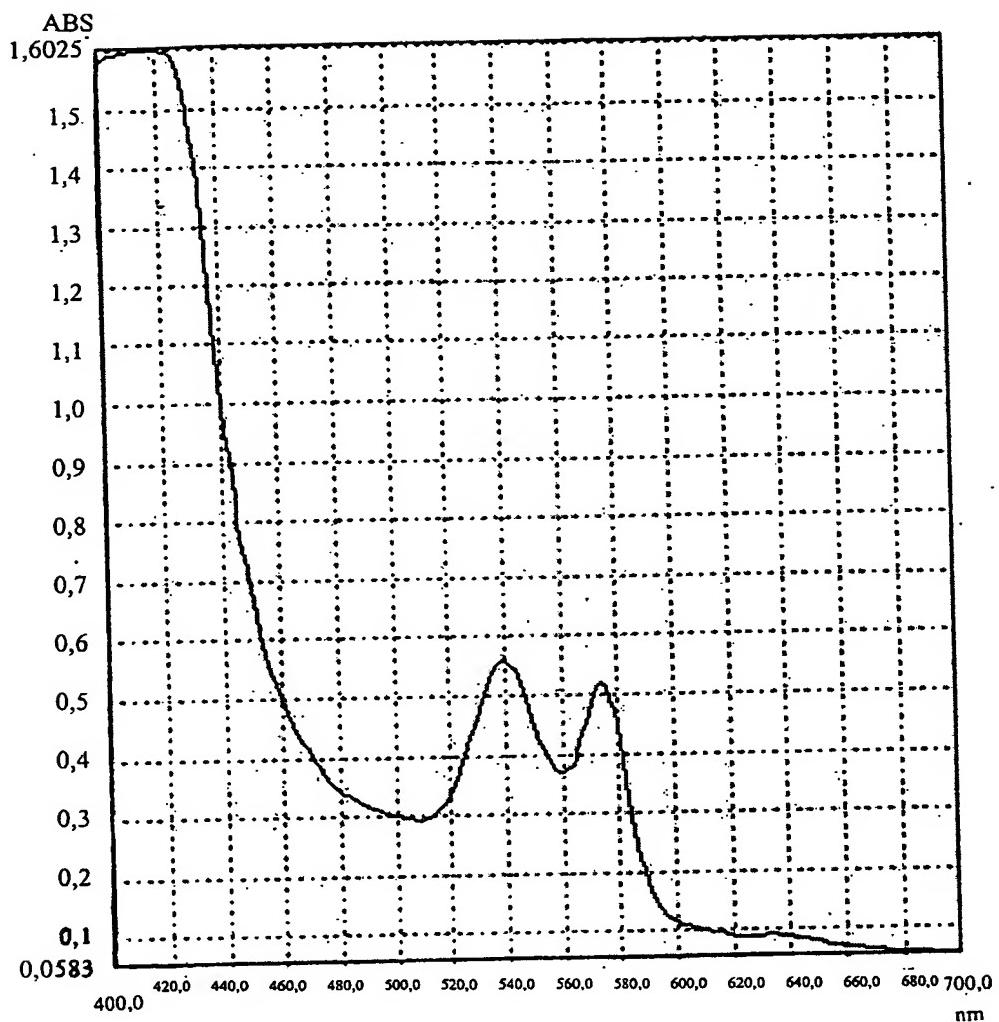


FIGURE 2

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

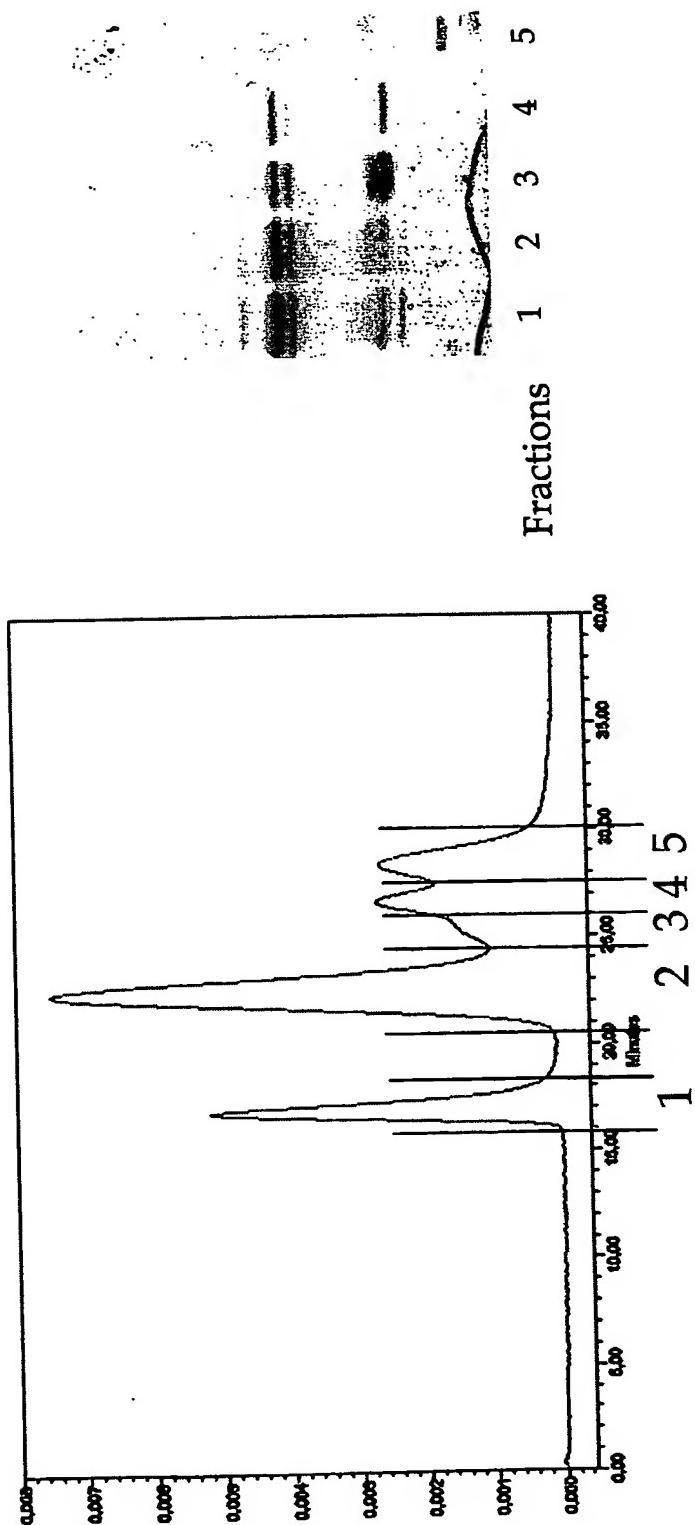


FIGURE 4

FIGURE 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

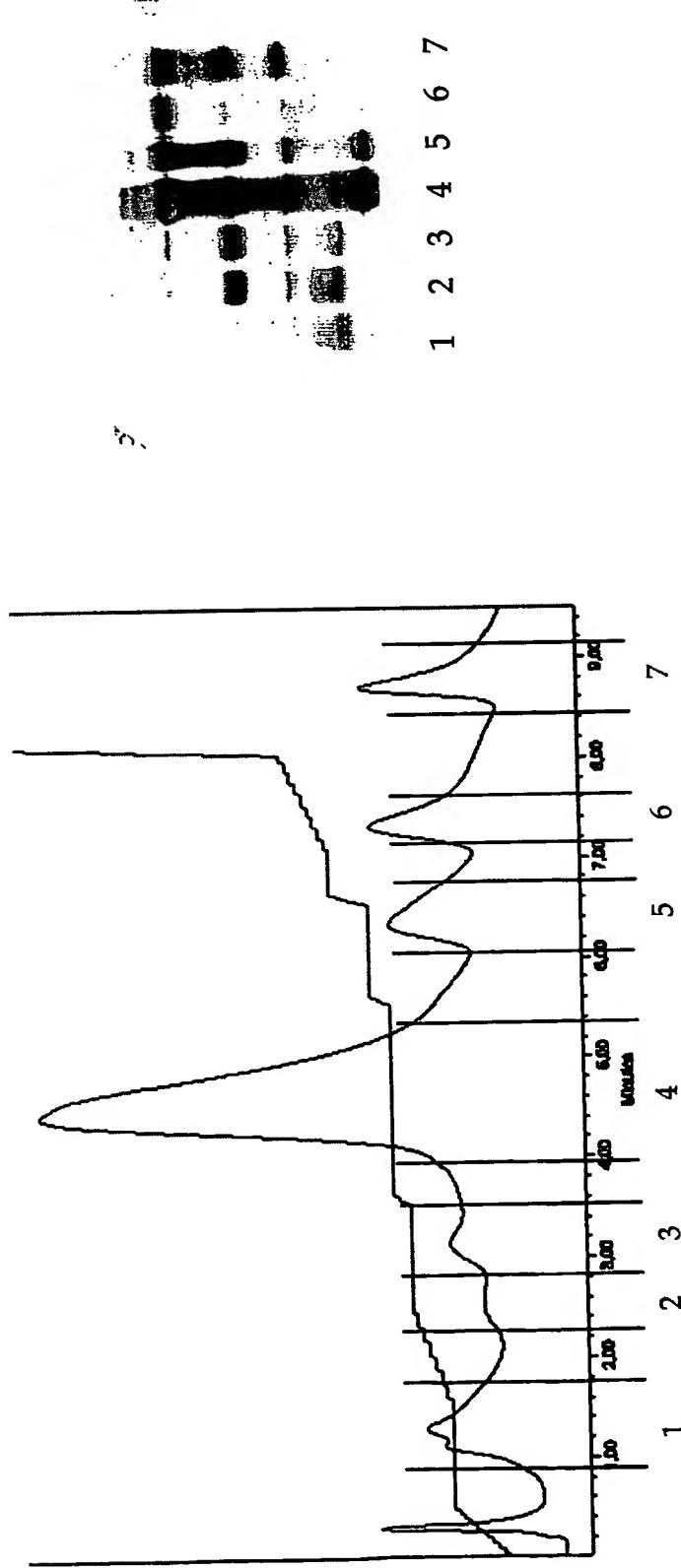


FIGURE 5

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

FIGURE 6

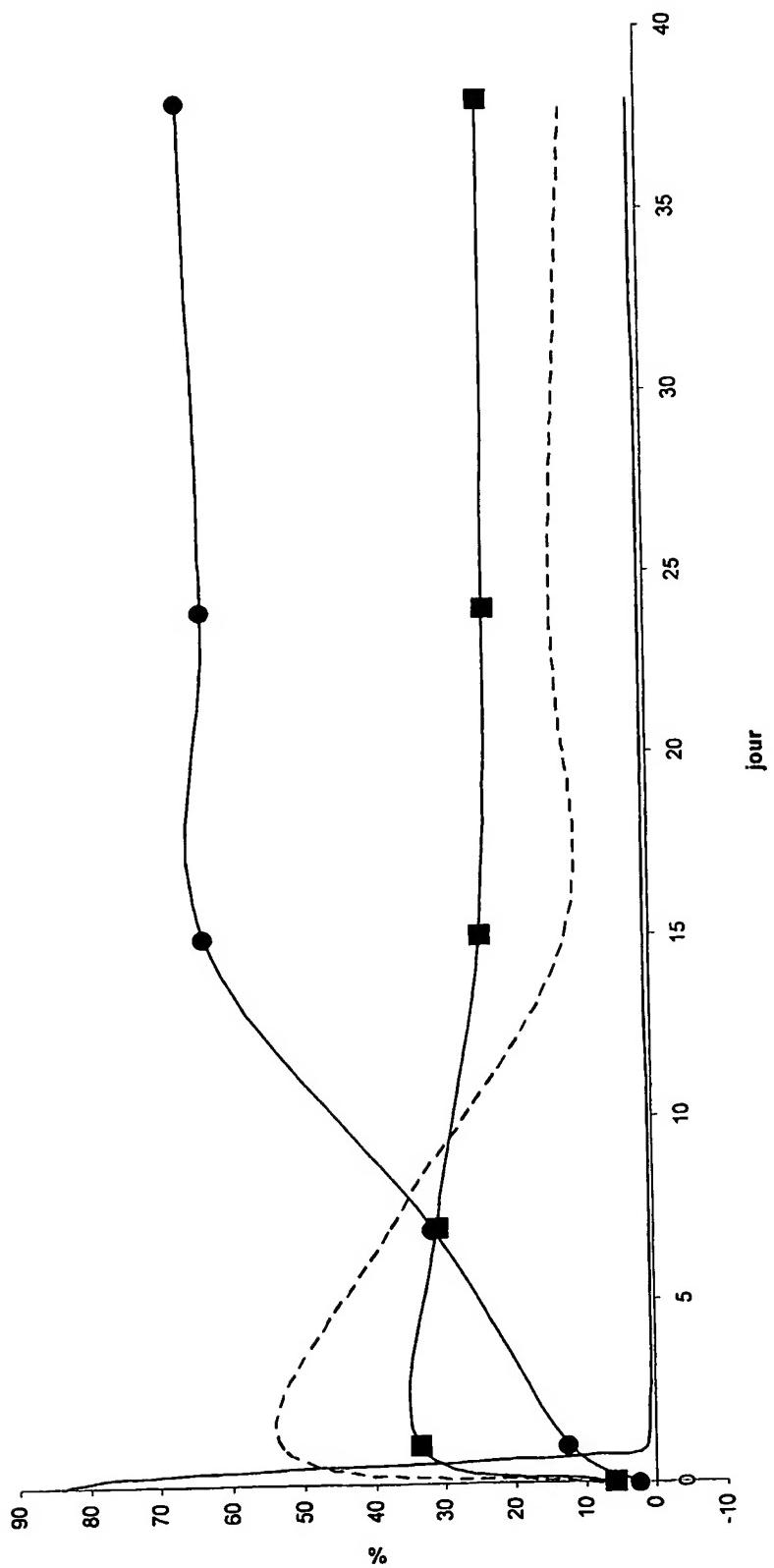


FIGURE 7

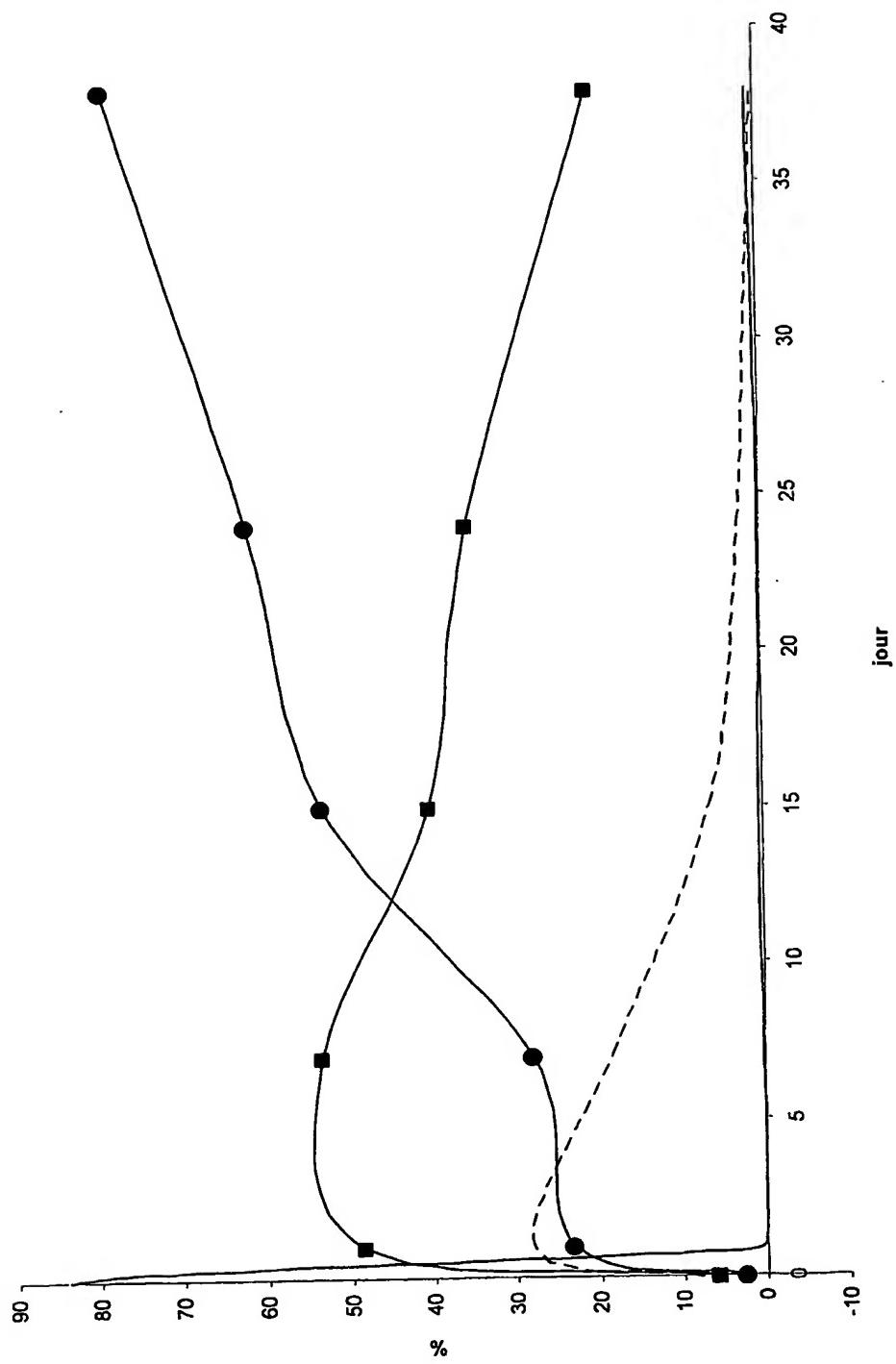


FIGURE 8

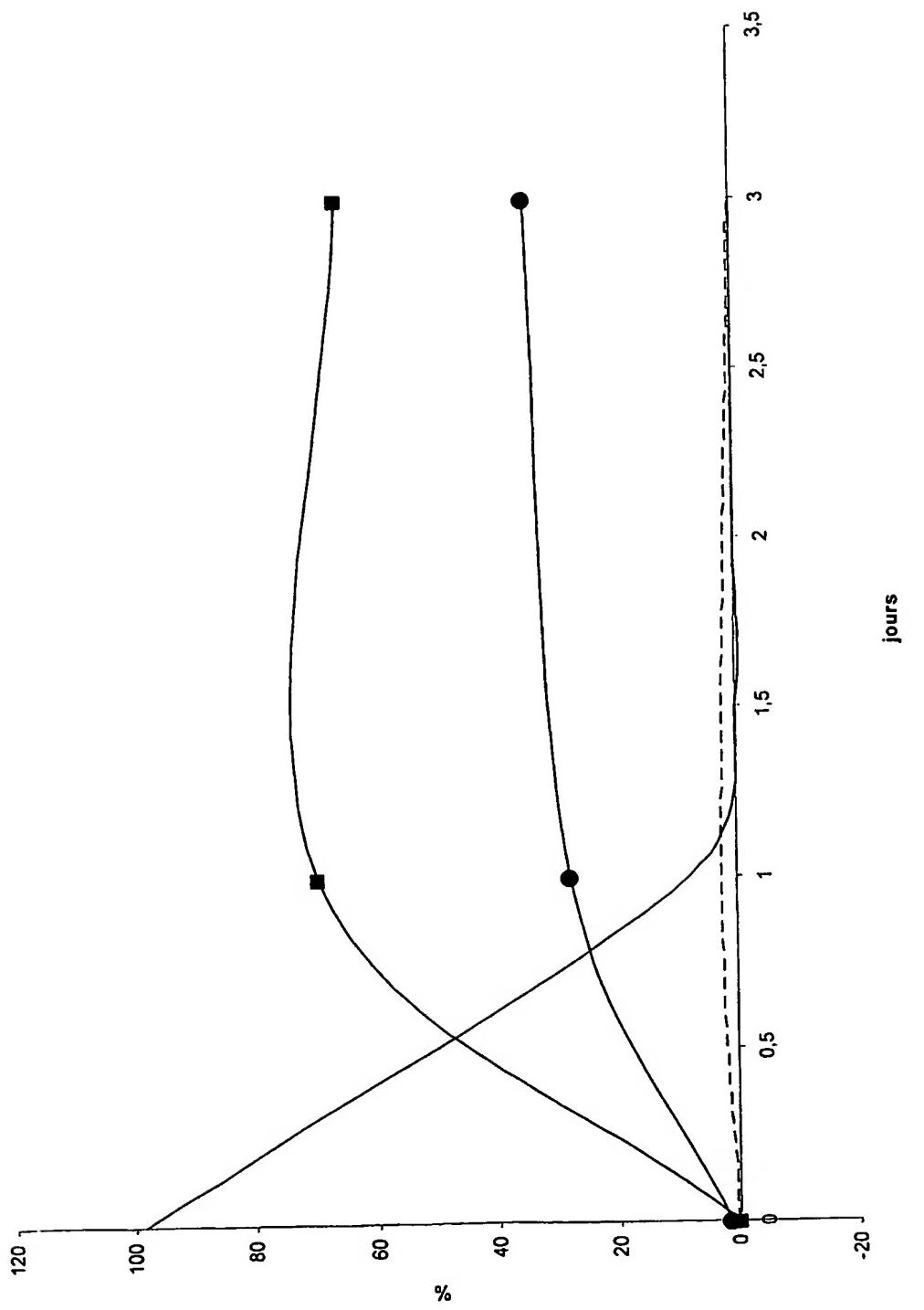
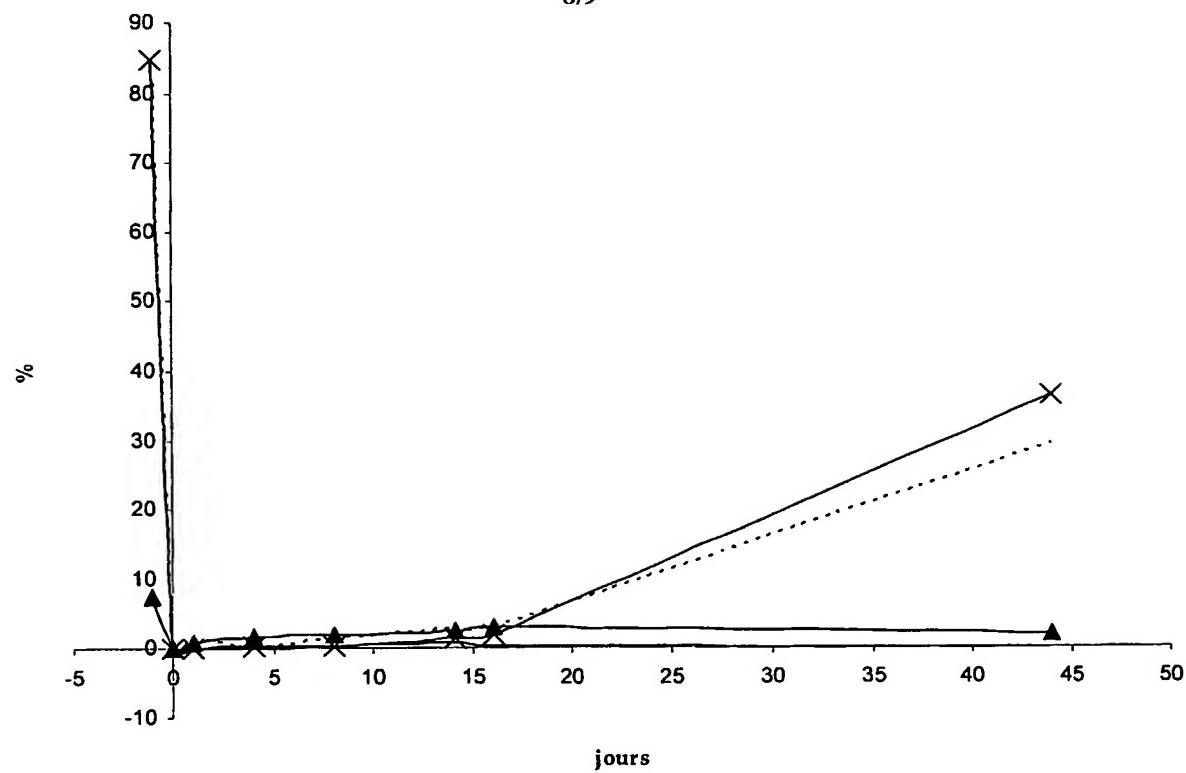
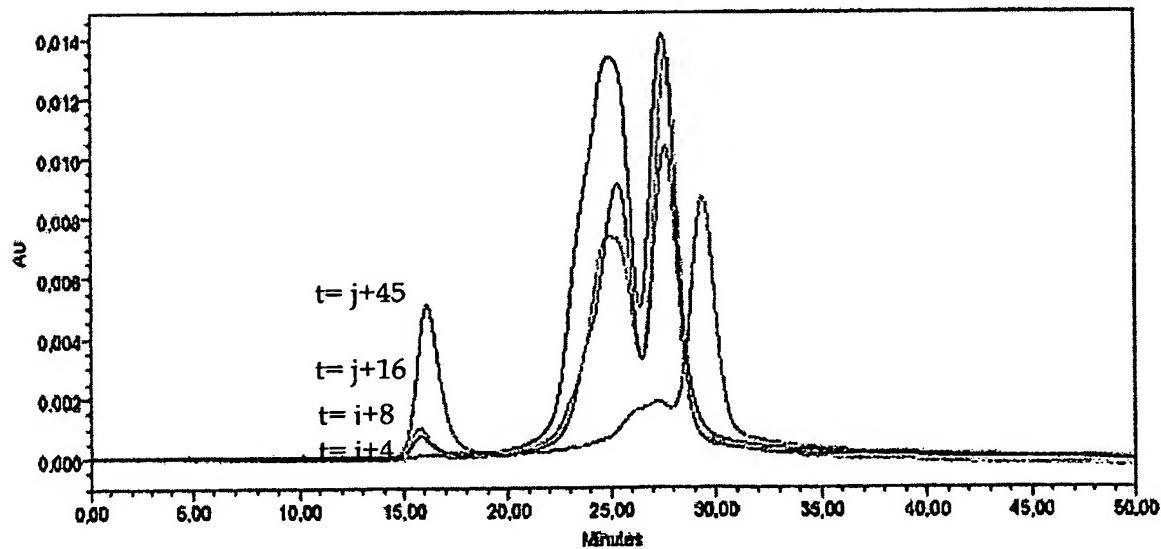


FIGURE 9

**FIGURE 10****FIGURE 11**

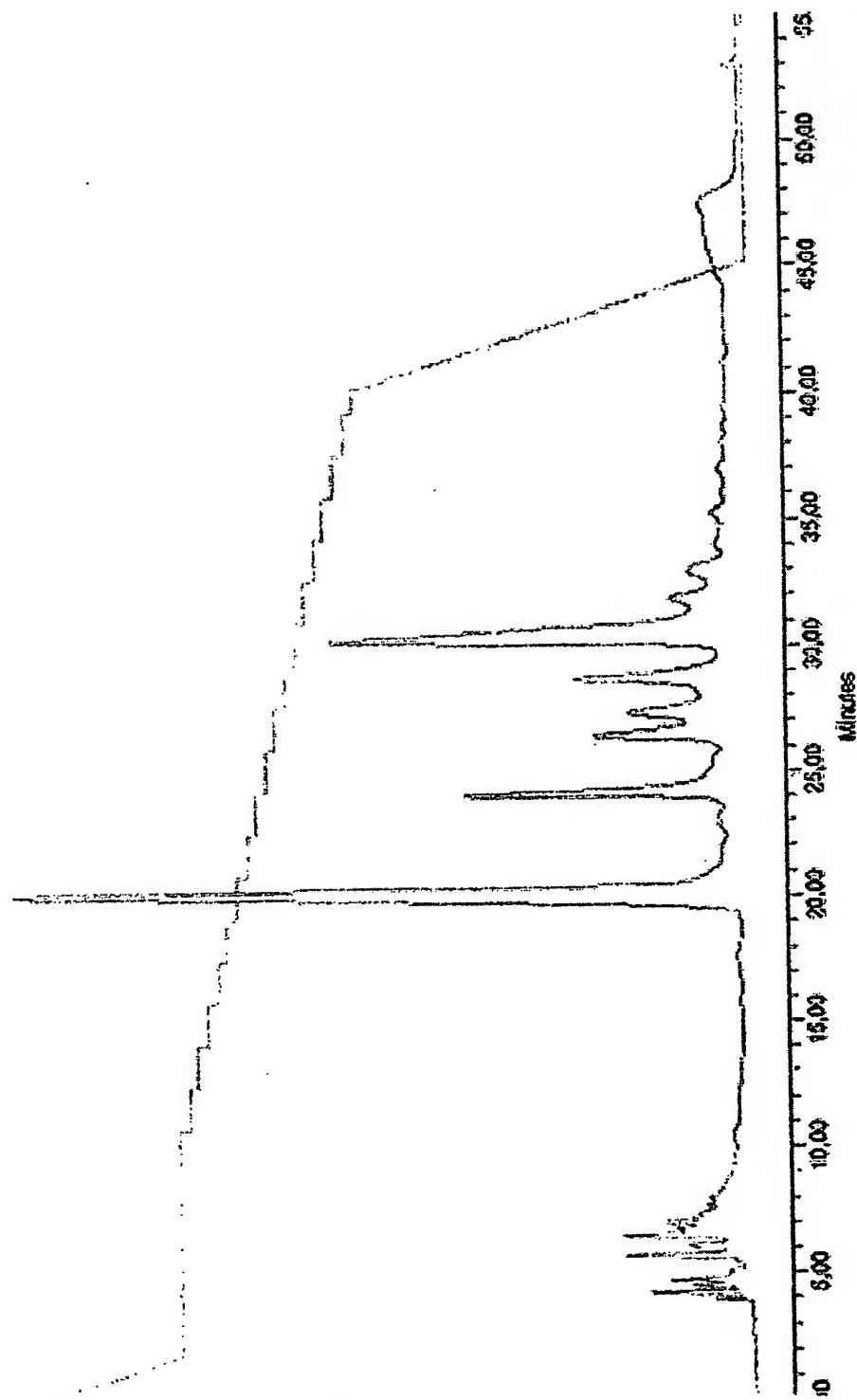


FIGURE 12

LISTE DE SEQUENCES

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
<120> PROCÉDÉ DE DISSOCIATION DE LA MOLÉCULE D'HÉMOGLOBINE EXTRACELLULAIRE D'ARENICOLA MARINA, CARACTÉRISATION DES CHAÎNES PROTÉIQUES CONSTITUANT LADITE MOLÉCULE ET DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES CODANT POUR LESDITES CHAÎNES PROTÉIQUES
<130> WO B CNR GLOB
<150> FR 03/11992
<151> 2003-10-14
<160> 31
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 474
<212> ADN
<213> Arenicola marina
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(474)
<223>

<400> 1 48
atg aag tcc ttg gtg gtt ctg ttc gcc ctg gtg gcc atg gtg gct gca
Met Lys Ser Leu Val Val Leu Phe Ala Leu Val Ala Met Val Ala Ala
1 5 10 15

gag tgc ggc ccc atg cag cgc ctc ctg gtc aag acc cag tgg aac aag 96
Glu Cys Gly Pro Met Gln Arg Leu Leu Val Lys Thr Gln Trp Asn Lys
20 25 30

gtg tac ggc acc agc aag gtc agg gac gag gcc gga cac gtc ctc tgg 144
Val Tyr Gly Thr Ser Lys Val Arg Asp Glu Ala Gly His Val Leu Trp
35 40 45

aag gct att ttc gcc cag gat ccc gag acc cgg gct ctc ttc aag aga 192
Lys Ala Ile Phe Ala Gln Asp Pro Glu Thr Arg Ala Leu Phe Lys Arg
50 55 60

gtc aac ggt gac gac atc tac tct ccc gag ttc atg gct cac agc gcc 240
Val Asn Gly Asp Asp Ile Tyr Ser Pro Glu Phe Met Ala His Ser Ala
65 70 75 80

cgt gtc ttg ggt ggc ctt gac att gcc atc tcc ctc ctc gac aac cag 288
Arg Val Leu Gly Gly Leu Asp Ile Ala Ile Ser Leu Leu Asp Asn Gln
85 90 95

gct gac ctt gac gtc gcc ctg gct cac ctt cac gtg cag cac gta gaa 336
Ala Asp Leu Asp Val Ala Leu Ala His Leu His Val Gln His Val Glu
100 105 110

agg cac atc cca acc cgc tac ttc gat ctg ttc aag aac gcc ctg atg 384
Arg His Ile Pro Thr Arg Tyr Phe Asp Leu Phe Lys Asn Ala Leu Met
115 120 125

gag tat gcc ccc agc gcc ctg gga cgc tgc ttc gat aag acc gcc tgg 432
 Glu Tyr Ala Pro Ser Ala Leu Gly Arg Cys Phe Asp Lys Thr Ala Trp
 130 135 140

```

agc tcg tgc ttt gac gtc atc gcc aac ggc atc aag gaa tag      474
Ser Ser Cys Phe Asp Val Ile Ala Asn Gly Ile Lys Glu
145           150           155

```

<210> 2
<211> 157
<212> PRT
<213> Arenicola marina

```

<400> 2
Met Lys Ser Leu Val Val Leu Phe Ala Leu Val Ala Met Val Ala Ala
1           5                   10                  15

```

Glu Cys Gly Pro Met Gln Arg Leu Leu Val Lys Thr Gln Trp Asn Lys
 20 25 30

Val Tyr Gly Thr Ser Lys Val Arg Asp Glu Ala Gly His Val Leu Trp
35 40 45

Lys Ala Ile Phe Ala Gln Asp Pro Glu Thr Arg Ala Leu Phe Lys Arg
50 55 60

Val Asn Gly Asp Asp Ile Tyr Ser Pro Glu Phe Met Ala His Ser Ala
65 70 75 80

Arg Val Leu Gly Gly Leu Asp Ile Ala Ile Ser Leu Leu Asp Asn Gln
85 90 95

Ala Asp Leu Asp Val Ala Leu Ala His Leu His Val Gln His Val Glu
 100 105 110

Arg His Ile Pro Thr Arg Tyr Phe Asp Leu Phe Lys Asn Ala Leu Met
115 120 125

Glu Tyr Ala Pro Ser Ala Leu Gly Arg Cys Phe Asp Lys Thr Ala Trp
 130 135 140

Ser Ser Cys Phe Asp Val Ile Ala Asn Gly Ile Lys Glu
145 150 155

<210> 3
<211> 477
<212> ADN
<213> *Arenicola marina*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(477)
<223>

<400> 3
atg aag ttc ttg gtg gtt ctg ttc gcc ctg gtg gcc atg gtc gct gct
Met Lys Phe Leu Val Val Leu Phe Ala Leu Val Ala Met Val Ala Ala
1 5 10 15

gat tgt ggc ccc atg cag cgc ctc ctg gtc aag gcc cag tgg aac aag 96
 Asp Cys Gly Pro Met Gln Arg Leu Leu Val Lys Ala Gln Trp Asn Lys
 20 25 30

gtg tac ggc acc agc aag gtc agg gac gac gcc gga cac gtc ctc tgg 144
 Val Tyr Gly Thr Ser Lys Val Arg Asp Asp Ala Gly His Val Leu Trp
 35 40 45

aag gct atc ttc aac cag gat ggt gag acc cgc gcc ctc ttc aac aga 192
 Lys Ala Ile Phe Asn Gln Asp Gly Glu Thr Arg Ala Leu Phe Asn Arg
 50 55 60

gtg cac ggt gac gac atc tac tct ccc gag ttc atg gct cac agc gcc 240
 Val His Gly Asp Asp Ile Tyr Ser Pro Glu Phe Met Ala His Ser Ala
 65 70 75 80

cgt gtc ttg ggt ggc ctt gac att gcc atc tcc ctc gac aac cag 288
 Arg Val Leu Gly Gly Leu Asp Ile Ala Ile Ser Leu Leu Asp Asn Gln
 85 90 95

gct gag ctt gac gct gtc ctg gct cac ctc aag gag cag cac att gag 336
 Ala Glu Leu Asp Ala Val Leu Ala His Leu Lys Glu Gln His Ile Glu
 100 105 110

agg ggg atc cca gac cgt tac ttc gac ctg ttc aag aac gcc ctg atg 384
 Arg Gly Ile Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Leu Phe Lys Asn Ala Leu Met
 115 120 125

gag ttt gcc ccc agc gcc ttg gga cgc tgc ttc ata aag gac gct tgg 432
 Glu Phe Ala Pro Ser Ala Leu Gly Arg Cys Phe Ile Lys Asp Ala Trp
 130 135 140

agc tca tgc ttt gac gtc att gcc aac ggc atc aag gga cag taa 477
 Ser Ser Cys Phe Asp Val Ile Ala Asn Gly Ile Lys Gly Gln
 145 150 155

<210> 4
<211> 158
<212> PRT
<213> Arenicola marina

<400> 4
Met Lys Phe Leu Val Val Leu Phe Ala Leu Val Ala Met Val Ala Ala
1 5 10 . 15

Asp Cys Gly Pro Met Gln Arg Leu Leu Val Lys Ala Gln Trp Asn Lys
20 25 30

Val Tyr Gly Thr Ser Lys Val Arg Asp Asp Ala Gly His Val Leu Trp
35 40 45

Lys Ala Ile Phe Asn Gln Asp Gly Glu Thr Arg Ala Leu Phe Asn Arg
50 55 60

Val His Gly Asp Asp Ile Tyr Ser Pro Glu Phe Met Ala His Ser Ala
65 70 . 75 80

Arg Val Leu Gly Gly Leu Asp Ile Ala Ile Ser Leu Leu Asp Asn Gln
85 90 95

Ala Glu Leu Asp Ala Val Leu Ala His Leu Lys Glu Gln His Ile Glu
 100 105 110

Arg Gly Ile Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Leu Phe Lys Asn Ala Leu Met
 115 120 125

Glu Phe Ala Pro Ser Ala Leu Gly Arg Cys Phe Ile Lys Asp Ala Trp
 130 135 140

Ser Ser Cys Phe Asp Val Ile Ala Asn Gly Ile Lys Gly Gln
 145 150 155

<210> 5

<211> 474

<212> ADN

<213> Arenicola marina

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(474)

<223>

<400> 5

atg aag gtc ctg atc gta ctg atg gcc tgc ttg gcc tac gtc gcc gcc	48
Met Lys Val Leu Ile Val Leu Met Ala Cys Leu Ala Tyr Val Ala Ala	
1 5 10 15	

gac tgc gga cct ctg cag agg ctg aag gtg aag cat cag tgg gtg cag	96
Asp Cys Gly Pro Leu Gln Arg Leu Lys Val Lys His Gln Trp Val Gln	
20 25 30	

gtg tac agc ggc cat ggt tac gag cgt gag gcg ttc ggc aga gag gtc	144
Val Tyr Ser Gly His Gly Tyr Glu Arg Glu Ala Phe Gly Arg Glu Val	
35 40 45	

ttc ctc gag atg tac aac cag gca ccc aag gcc aag gac ctc ttc acc	192
Phe Leu Glu Met Tyr Asn Gln Ala Pro Lys Ala Lys Asp Leu Phe Thr	
50 55 60	

agg gtc agg ggc gag aac gtc ttc ccc gag ttc gga gcc cac atg	240
Arg Val Arg Gly Glu Asn Val Phe Ser Pro Glu Phe Gly Ala His Met	
65 70 75 80	

gtc cgt gtg ctc gga ctc gac atg tgc atc gct ctg ctg tcc gat	288
Val Arg Val Leu Gly Leu Asp Met Cys Ile Ala Leu Leu Ser Asp	
85 90 95	

gac acc gtc ctc aac gcc cag ctt gct cac ctc agc acg cag cac aag	336
Asp Thr Val Leu Asn Ala Gln Leu Ala His Leu Ser Thr Gln His Lys	
100 105 110	

gac cgt gga atc ccc aac gag tac ttc gat gtg atg aag gtc gcc ctc	384
Asp Arg Gly Ile Pro Asn Glu Tyr Phe Asp Val Met Lys Val Ala Leu	
115 120 125	

atg aag gtc gtc ccc ggc cac gtt tca cac ttc gac ttc gat gcc tgg	432
Met Lys Val Val Pro Gly His Val Ser His Phe Asp Phe Asp Ala Trp	
130 135 140	

tct gcc tgc tat gac gtc atc gcc aac ggc atc aag cac taa
 Ser Ala Cys Tyr Asp Val Ile Ala Asn Gly Ile Lys His
 145 150 155

474

<210> 6
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Arenicola marina

<400> 6
 Met Lys Val Leu Ile Val Leu Met Ala Cys Leu Ala Tyr Val Ala Ala
 1 5 10 15

Asp Cys Gly Pro Leu Gln Arg Leu Lys Val Lys His Gln Trp Val Gln
 20 25 30

Val Tyr Ser Gly His Gly Tyr Glu Arg Glu Ala Phe Gly Arg Glu Val
 35 40 45

Phe Leu Glu Met Tyr Asn Gln Ala Pro Lys Ala Lys Asp Leu Phe Thr
 50 55 60

Arg Val Arg Gly Glu Asn Val Phe Ser Pro Glu Phe Gly Ala His Met
 65 70 75 80

Val Arg Val Leu Gly Gly Leu Asp Met Cys Ile Ala Leu Leu Ser Asp
 85 90 95

Asp Thr Val Leu Asn Ala Gln Leu Ala His Leu Ser Thr Gln His Lys
 100 105 110

Asp Arg Gly Ile Pro Asn Glu Tyr Phe Asp Val Met Lys Val Ala Leu
 115 120 125

Met Lys Val Val Pro Gly His Val Ser His Phe Asp Phe Asp Ala Trp
 130 135 140

Ser Ala Cys Tyr Asp Val Ile Ala Asn Gly Ile Lys His
 145 150 155

<210> 7
 <211> 498
 <212> ADN
 <213> Arenicola marina

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(498)
 <223>

<400> 7
 atg ctt cgt ttc gta gca ctc ttg gct ctg gtc ggc ctg gcc gtc tgt
 Met Leu Arg Phe Val Ala Leu Leu Ala Leu Val Gly Leu Ala Val Cys
 1 5 10 15

48

gac gac tgt tgt acc acc gag gac cgcc aag gag gtc cag acg ctg tgg
 Asp Asp Cys Cys Thr Thr Glu Asp Arg Lys Glu Val Gln Thr Leu Trp
 20 25 30

96

agt gag atc tgg agt gcc cag ttc act ggt cgc cgt gtc cag gtt gcc Ser Glu Ile Trp Ser Ala Gln Phe Thr Gly Arg Arg Val Gln Val Ala	144
35 40 45	
cag gct gtg ttc gag gac ctc ttc cgc cgc gac ccc gag tcc aag aac Gln Ala Val Phe Glu Asp Leu Phe Arg Arg Asp Pro Glu Ser Lys Asn	192
50 55 60	
ctg ttc aag cgc gtc aat gtt gac gac atg aac agc ccc gaa ttc cac Leu Phe Lys Arg Val Asn Val Asp Asp Met Asn Ser Pro Glu Phe His	240
65 70 75 80	
gct cac tgc atc cgt gtt gtc aac ggt ctt gac acc gtc atc ggt ctc Ala His Cys Ile Arg Val Val Asn Gly Leu Asp Thr Val Ile Gly Leu	288
85 90 95	
ctt gac gac ccc gac acc ctg aag tcc cag ctc gag cac ttg gcc cag Leu Asp Asp Pro Asp Thr Leu Lys Ser Gln Leu Glu His Leu Ala Gln	336
100 105 110	
cag cac aag gag cgt gat ggc atc cac aag acc cac ttc gac gag atg Gln His Lys Glu Arg Asp Gly Ile His Lys Thr His Phe Asp Glu Met	384
115 120 125	
tcc cac gcc ttc ggc gcc gtc atg ccc cag gtc agc agc tgc ttc aac Ser His Ala Phe Gly Ala Val Met Pro Gln Val Ser Ser Cys Phe Asn	432
130 135 140	
ccc gat gcc tgg aac cgt tgc ttc ggc tcc atc gct acc aag att gct Pro Asp Ala Trp Asn Arg Cys Phe Gly Ser Ile Ala Thr Lys Ile Ala	480
145 150 155 160	
tcc ctc ctc gag gat taa Ser Leu Leu Glu Asp	498
165	

<210> 8
<211> 165
<212> PRT
<213> Arenicola marina

<400> 8 Met Leu Arg Phe Val Ala Leu Leu Ala Leu Val Gly Leu Ala Val Cys 1 5 10 15	
Asp Asp Cys Cys Thr Thr Glu Asp Arg Lys Glu Val Gln Thr Leu Trp 20 25 30	
Ser Glu Ile Trp Ser Ala Gln Phe Thr Gly Arg Arg Val Gln Val Ala 35 40 45	
Gln Ala Val Phe Glu Asp Leu Phe Arg Arg Asp Pro Glu Ser Lys Asn 50 55 60	
Leu Phe Lys Arg Val Asn Val Asp Asp Met Asn Ser Pro Glu Phe His 65 70 75 80	
Ala His Cys Ile Arg Val Val Asn Gly Leu Asp Thr Val Ile Gly Leu 85 90 95	

Leu Asp Asp Pro Asp Thr Leu Lys Ser Gln Leu Glu His Leu Ala Gln
100 105 110

Gln His Lys Glu Arg Asp Gly Ile His Lys Thr His Phe Asp Glu Met
115 120 125

Ser His Ala Phe Gly Ala Val Met Pro Gln Val Ser Ser Cys Phe Asn
 130 135 140

Pro Asp Ala Trp Asn Arg Cys Phe Gly Ser Ile Ala Thr Lys Ile Alan
 145 150 155 160

Ser Leu Leu Glu Asp
165

<210> 9
<211> 498
<212> ADN
<213> Arenicola marina

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(498)
<223>

<400> 9
atg atg tcc gtc gtg ttc ctc ctc ggc ctt gtg gcc tac gcc tcc gcc
Met Met Ser Val Val Phe Leu Leu Gly Leu Val Ala Tyr Ala Ser Ala
1 5 10 15

tcc agc tgc tgc tcc tat gga gac cag cag aag gtc aag gcc cag tgg
 Ser Ser Cys Cys Ser Tyr Gly Asp Gln Gln Lys Val Lys Ala Gln Trp
 20 25 30

```

aac agc ctc tgg aac acc cct gac tcc tcc aca tcc aag atc atc ttc
Asn Ser Leu Trp Asn Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ser Lys Ile Ile Phe
          35           40           45

```

```

gga aag gaa gtc ttc gca cgc ttc ttc gag gtt gac ccc gag agc aag
Gly Lys Glu Val Phe Ala Arg Phe Phe Glu Val Asp Pro Glu Ser Lys
      50          55          60

```

```

agc ctg ttc ggt cgc gtc aag gtt gaa gac ccc gac agc ccc gag ttc
Ser Leu Phe Gly Arg Val Lys Val Glu Asp Pro Asp Ser Pro Glu Phe
65           70           75           80

```

```

gcc gga cac gtg atc cgt gtt ttg acc ggt ctg gat ttg atc atc aac
Ala Gly His Val Ile Arg Val Leu Thr Gly Leu Asp Leu Ile Ile Asn
          85           90           95

```

```

ttg atg ggt gac gat gcc atg gat gcc gag ctg gcc cac ctt aac acc
Leu Met Gly Asp Asp Ala Met Asp Ala Glu Leu Ala His Leu Asn Thr
          100           105           110

```

cag cat ttg gcc aga gag gga atc acc gga acc cac ttc acc gag atg
 Gln His Leu Ala Arg Glu Gly Ile Thr Gly Thr His Phe Thr Glu Met
 115 120 125

ttc aag gtc ctg gat gga tcc ctc cgc cag gtt ctc gag gag tac gat 432
 Phe Lys Val Leu Asp Gly Ser Leu Arg Gln Val Leu Glu Glu Tyr Asp
 130 135 140

tcc ctg tcc tgg agg tac tgc ttc cgt ggt ctg ggc gcc gcc ctc agg 480
 Ser Leu Ser Trp Arg Tyr Cys Phe Arg Gly Leu Gly Ala Ala Leu Arg
 145 150 155 160

gat ggt ctc ccc gca taa 498
 Asp Gly Leu Pro Ala
 165

<210> 10
<211> 165
<212> PRT
<213> Arenicola marina

<400> 10
Met Met Ser Val Val Phe Leu Leu Gly Leu Val Ala Tyr Ala Ser Ala 15
1 5 10 15

Ser Ser Cys Cys Ser Tyr Gly Asp Gln Gln Lys Val Lys Ala Gln Trp
20 25 30

Asn Ser Leu Trp Asn Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ser Lys Ile Ile Phe
35 40 45

Gly Lys Glu Val Phe Ala Arg Phe Phe Glu Val Asp Pro Glu Ser Lys
50 55 60

Ser Leu Phe Gly Arg Val Lys Val Glu Asp Pro Asp Ser Pro Glu Phe
65 70 75 80

Ala Gly His Val Ile Arg Val Leu Thr Gly Leu Asp Leu Ile Ile Asn
85 90 95

Leu Met Gly Asp Asp Ala Met Asp Ala Glu Leu Ala His Leu Asn Thr
100 105 110

Gln His Leu Ala Arg Glu Gly Ile Thr Gly Thr His Phe Thr Glu Met
115 120 125

Phe Lys Val Leu Asp Gly Ser Leu Arg Gln Val Leu Glu Glu Tyr Asp
130 135 140

Ser Leu Ser Trp Arg Tyr Cys Phe Arg Gly Leu Gly Ala Ala Leu Arg
145 150 155 160

Asp Gly Leu Pro Ala
165

<210> 11
<211> 771
<212> ADN
<213> Arenicola marina

<220>
<221> CDS

<222> (1) .. (771)

<223>

<400> 11
 atg aag agc tac gtg ctc gtg tgc tgc ctc gtg gtg ggg gcc gtg gcc
 Met Lys Ser Tyr Val Leu Val Cys Cys Leu Val Val Gly Ala Val Ala
 1 5 10 15
 48
 tac ccc cac gag gtg atg cac cat gcc gtt ggc gca aac cga atg tgc
 Tyr Pro His Glu Val Met His His Ala Val Gly Ala Asn Arg Met Cys
 20 25 30
 96
 aag tgt gat gcc ccg gca ggg aac gcc gaa acc tcc gcc gac aga gag
 Lys Cys Asp Ala Pro Ala Gly Asn Ala Glu Thr Ser Ala Asp Arg Glu
 35 40 45
 144
 cag agt cac act ctc gat gag ttg acc cat cag ttg cac atg ctg cag
 Gln Ser His Thr Leu Asp Glu Leu Thr His Gln Leu His Met Leu Gln
 50 55 60
 192
 caa gcc tac gac acc ggc atg ggt cgt gtc gat gac gtg atg gag gac
 Gln Ala Tyr Asp Thr Gly Met Gly Arg Val Asp Asp Val Met Glu Asp
 65 70 75 80
 240
 atg gac gac ctg tcc cac agg atc gcc gac cac gag aag gaa cac tgt
 Met Asp Asp Leu Ser His Arg Ile Ala Asp His Glu Lys Glu His Cys
 85 90 95
 288
 aag aag tat aga gag ttc cag tgc ggt ggt gac cat cca aag tgc atc
 Lys Lys Tyr Arg Glu Phe Gln Cys Gly Gly Asp His Pro Lys Cys Ile
 100 105 110
 336
 tcg aac ctc ctc gtc gac ggt gac aac gac tgt gac aat gga gct
 Ser Asn Leu Leu Val Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Asp Asn Gly Ala
 115 120 125
 384
 gat gag gct cgt tgt gat gtg ctc acc gag gct ggt agt agt tgg act
 Asp Glu Ala Arg Cys Asp Val Leu Thr Glu Ala Gly Ser Ser Trp Thr
 130 135 140
 432
 ggt act gtg gtc tac gat cac tgc acc aag cgt cgc cca gag acc atg
 Gly Thr Val Val Tyr Asp His Cys Thr Lys Arg Arg Pro Glu Thr Met
 145 150 155 160
 480
 aag ctc agc atc aag agc gtg gat acc gta ccc ttc ttc acc acc cac
 Lys Leu Ser Ile Lys Ser Val Asp Thr Val Pro Phe Phe Thr Thr His
 165 170 175
 528
 ccc aag gtc cgc ggt acc gtc ctt atg gag aag cac acc aag gac tac
 Pro Lys Val Arg Gly Thr Val Leu Met Glu Lys His Thr Lys Asp Tyr
 180 185 190
 576
 agc gag gtc atc aac gag ccg gtc tct ggc tac tgg agc agc gcc gat
 Ser Glu Val Ile Asn Glu Pro Val Ser Gly Tyr Trp Ser Ser Ala Asp
 195 200 205
 624
 agg agc gcc gct atg ccc ccg gac agc gcc ggt cac ctt ggc ttt gtc
 Arg Ser Ala Ala Met Pro Pro Asp Ser Ala Gly His Leu Gly Phe Val
 210 215 220
 672

tgc atc ttc cac ggc cac gac cac gac acc tgc act ggt ctc ctc acc 720
 Cys Ile Phe His Gly His Asp His Asp Thr Cys Thr Gly Leu Leu Thr
 225 230 235 240

aag ggc aag gtc aca gat gcc tgc gcc gag ttc acc ttc cac agg gat 768
 Lys Gly Lys Val Thr Asp Ala Cys Ala Glu Phe Thr Phe His Arg Asp
 245 250 255

taa 771

<210> 12
<211> 256
<212> PRT
<213> Arenicola marina

<400> 12
Met Lys Ser Tyr Val Leu Val Cys Cys Leu Val Val Gly Ala Val Ala
1 5 10 15

Tyr Pro His Glu Val Met His His Ala Val Gly Ala Asn Arg Met Cys
20 25 30

Lys Cys Asp Ala Pro Ala Gly Asn Ala Glu Thr Ser Ala Asp Arg Glu
35 40 45

Gln Ser His Thr Leu Asp Glu Leu Thr His Gln Leu His Met Leu Gln
50 55 60

Gln Ala Tyr Asp Thr Gly Met Gly Arg Val Asp Asp Val Met Glu Asp
65 70 75 80

Met Asp Asp Leu Ser His Arg Ile Ala Asp His Glu Lys Glu His Cys
85 90 95

Lys Lys Tyr Arg Glu Phe Gln Cys Gly Gly Asp His Pro Lys Cys Ile
100 105 110

Ser Asn Leu Leu Val Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Asp Asn Gly Ala
115 120 125

Asp Glu Ala Arg Cys Asp Val Leu Thr Glu Ala Gly Ser Ser Trp Thr
130 135 140

Gly Thr Val Val Tyr Asp His Cys Thr Lys Arg Arg Pro Glu Thr Met
145 150 155 160

Lys Leu Ser Ile Lys Ser Val Asp Thr Val Pro Phe Phe Thr Thr His
165 170 175

Pro Lys Val Arg Gly Thr Val Leu Met Glu Lys His Thr Lys Asp Tyr
180 185 190

Ser Glu Val Ile Asn Glu Pro Val Ser Gly Tyr Trp Ser Ser Ala Asp
195 200 205

Arg Ser Ala Ala Met Pro Pro Asp Ser Ala Gly His Leu Gly Phe Val
210 215 220

Cys Ile Phe His Gly His Asp His Asp Thr Cys Thr Gly Leu Leu Thr
225 230 235 240

Lys Gly Lys Val Thr Asp Ala Cys Ala Glu Phe Thr Phe His Arg Asp
245 250 255

<210> 13
<211> 376
<212> ADN
<213> *Arenicola marina*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(375)
<223>

```

<400> 13
gga cct ttg cag cgc ctc ctg gtc aag acc cag tgg aac aag gtg tac
Gly Pro Leu Gln Arg Leu Leu Val Lys Thr Gln Trp Asn Lys Val Tyr
1          5                  10                 15

```

```

ggc acc agc aag gtc agg gac gag gcc gga cac gtc ctc tgg aag gct 96
Gly Thr Ser Lys Val Arg Asp Glu Ala Gly His Val Leu Trp Lys Ala
          20           25           30

```

att ttc gcc cag gat ccc gag acc cg^g gct ctc ttc aag aga gtc aac
 Ile Phe Ala Gln Asp Pro Glu Thr Arg Ala Leu Phe Lys Arg Val Asn
 35 40 45

```

ggc gac gac atc tac tct ccc gag ttc atg gct cac agc gcc cgt gtc 192
Gly Asp Asp Ile Tyr Ser Pro Glu Phe Met Ala His Ser Ala Arg Val
      50          55          60

```

ttg ggt ggc ctt gac att gcc atc tcc ctc ctc gac aac cag gct gac 240
 Leu Gly Gly Leu Asp Ile Ala Ile Ser Leu Leu Asp Asn Gln Ala Asp
 65 70 75 80

ctt gac gtc gcc ctg gct cac ctt cac gtg cag cac gta gaa agg cac 288
 Leu Asp Val Ala Leu Ala His Leu His Val Gln His Val Glu Arg His
 85 90 95

atc cca acc cgc tac ttc gat ctg ttc aag aac gcc ctg atg gag tat 336
Ile Pro Thr Arg Tyr Phe Asp Leu Phe Lys Asn Ala Leu Met Glu Tyr
100 105 110

376
 gcc ccc agc gcc ctg gga cgc tgc ttt gat aag gac gca t
 Ala Pro Ser Ala Leu Gly Arg Cys Phe Asp Lys Asp Ala
 115 120 125

<210> 14
<211> 125
<212> PRT
<213> *Arenicola marina*

<400> 14
Gly Pro Leu Gln Arg Leu Leu Val Lys Thr Gln Trp Asn Lys Val Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Ser Lys Val Arg Asp Glu Ala Gly His Val Leu Trp Lys Ala
20 25 30

Ile Phe Ala Gln Asp Pro Glu Thr Arg Ala Leu Phe Lys Arg Val Asn
 35 40 45

Gly Asp Asp Ile Tyr Ser Pro Glu Phe Met Ala His Ser Ala Arg Val
 50 55 60

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Ala Ile Ser Leu Leu Asp Asn Gln Ala Asp
 65 70 75 80

Leu Asp Val Ala Leu Ala His Leu His Val Gln His Val Glu Arg His
 85 90 95

Ile Pro Thr Arg Tyr Phe Asp Leu Phe Lys Asn Ala Leu Met Glu Tyr
 100 105 110

Ala Pro Ser Ala Leu Gly Arg Cys Phe Asp Lys Asp Ala
 115 120 125

<210> 15

<211> 288

<212> ADN

<213> Arenicola marina

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(288)

<223>

<400> 15

tgc gga ccc ctt cag cgc ctg aag gtc aag cgc cag tgg gct gag gct
 Cys Gly Pro Leu Gln Arg Leu Lys Val Lys Arg Gln Trp Ala Glu Ala
 1 5 10 15

48

tat gga agc gga aac agc agg gag gaa ttc gga cac ttc atc tgg tcc
 Tyr Gly Ser Gly Asn Ser Arg Glu Glu Phe Gly His Phe Ile Trp Ser
 20 25 30

96

cat gtc ttc cag cac tcg cct gct gcc cgc gac atg ttc aag cgc gtc
 His Val Phe Gln His Ser Pro Ala Ala Arg Asp Met Phe Lys Arg Val
 35 40 45

144

cgc ggt gac aac atc cac acc cca gca ttc atg gcc cac gcc acc cgt
 Arg Gly Asp Asn Ile His Thr Pro Ala Phe Met Ala His Ala Thr Arg
 50 55 60

192

gtg ctc ggt gga ctc gac atg tgc att gcc ctt ctc gat gat gaa ccc
 Val Leu Gly Gly Leu Asp Met Cys Ile Ala Leu Leu Asp Asp Glu Pro
 65 70 75 80

240

gtt ctg aac acg cag ctc gct cat ctt gcc aag caa cac gaa acc cgt
 Val Leu Asn Thr Gln Leu Ala His Leu Ala Lys Gln His Glu Thr Arg
 85 90 95

288

<210> 16

<211> 96

<212> PRT

<213> Arenicola marina

<400> 16
 Cys Gly Pro Leu Gln Arg Leu Lys Val Lys Arg Gln Trp Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Tyr Gly Ser Gly Asn Ser Arg Glu Glu Phe Gly His Phe Ile Trp Ser
 20 25 30

His Val Phe Gln His Ser Pro Ala Ala Arg Asp Met Phe Lys Arg Val
 35 40 45

Arg Gly Asp Asn Ile His Thr Pro Ala Phe Met Ala His Ala Thr Arg
 50 55 60

Val Leu Gly Gly Leu Asp Met Cys Ile Ala Leu Leu Asp Asp Glu Pro
 65 70 75 80

Val Leu Asn Thr Gln Leu Ala His Leu Ala Lys Gln His Glu Thr Arg
 85 90 95

<210> 17

<211> 360

<212> ADN

<213> Arenicola marina

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<223>

<400> 17
 aag gtg aag cac caa tgg gtg cag gtg tac agc ggc cat ggt tac gag 48
 Lys Val Lys His Gln Trp Val Gln Val Tyr Ser Gly His Gly Tyr Glu
 1 5 10 15

cgt gag gcg ttc ggc aga gag gtc ttc ctc gag atg tac aac cag gca 96
 Arg Glu Ala Phe Gly Arg Glu Val Phe Leu Glu Met Tyr Asn Gln Ala
 20 25 30

ccc aag gcc aag gac ctc ttc acc agg gtc agg ggc gag aac gtc ttc 144
 Pro Lys Ala Lys Asp Leu Phe Thr Arg Val Arg Gly Glu Asn Val Phe
 35 40 45

tcc ccc gag ttc gga gcc cac atg gtc cgt gtg ctc gga ggt ctc gac 192
 Ser Pro Glu Phe Gly Ala His Met Val Arg Val Leu Gly Gly Leu Asp
 50 55 60

atg tgc atc gct ctg ctg tcc gat gac acc gtc ctc aac gcc cag ctt 240
 Met Cys Ile Ala Leu Leu Ser Asp Asp Thr Val Leu Asn Ala Gln Leu
 65 70 75 80

gct cac ctc agc acg cag cac aag gac cgt gga atc ccc aac gag tac 288
 Ala His Leu Ser Thr Gln His Lys Asp Arg Gly Ile Pro Asn Glu Tyr
 85 90 95

ttc gat gtg gtg aag gtc gcc ctc atg aag gtc gtc ccc ggc cac gtt 336
 Phe Asp Val Val Lys Val Ala Leu Met Lys Val Val Pro Gly His Val
 100 105 110

tca cac ttc gat atc ggc gcg tgg
 Ser His Phe Asp Ile Gly Ala Trp
 115 120

360

<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213> Arenicola marina

<400> 18
Lys Val Lys His Gln Trp Val Gln Val Tyr Ser Gly His Gly Tyr Glu
1 5 10 15
Arg Glu Ala Phe Gly Arg Glu Val Phe Leu Glu Met Tyr Asn Gln Ala
20 25 30
Pro Lys Ala Lys Asp Leu Phe Thr Arg Val Arg Gly Glu Asn Val Phe
35 40 45
Ser Pro Glu Phe Gly Ala His Met Val Arg Val Leu Gly Gly Leu Asp
50 55 60
Met Cys Ile Ala Leu Leu Ser Asp Asp Thr Val Leu Asn Ala Gln Leu
65 70 75 80
Ala His Leu Ser Thr Gln His Lys Asp Arg Gly Ile Pro Asn Glu Tyr
85 90 95
Phe Asp Val Val Lys Val Ala Leu Met Lys Val Val Pro Gly His Val
100 105 110
Ser His Phe Asp Ile Gly Ala Trp
115 120

<210> 19
<211> 390
<212> ADN
<213> Arenicola marina

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(390)
<223>

<400> 19
tgt tgc agt ata gag gac cgc aag gag gtc cag acg ctg tgg agt gag 48
Cys Cys Ser Ile Glu Asp Arg Lys Glu Val Gln Thr Leu Trp Ser Glu
1 5 10 15
atc tgg agt gcc cag ttc act ggt cgc cgt gtc cag gtt gcc cag gct 96
Ile Trp Ser Ala Gln Phe Thr Gly Arg Arg Val Gln Val Ala Gln Ala
20 25 30
gtg ttc gag gac ctc ttc cgc cgc gac ccc gag tcc aag aac ctg ttc
Val Phe Glu Asp Leu Phe Arg Arg Asp Pro Glu Ser Lys Asn Leu Phe
35 40 45

144

aag cgc gtc aat gtt gac gac atg aac agc ccc gaa ttc cac gct cac Lys Arg Val Asn Val Asp Asp Met Asn Ser Pro Glu Phe His Ala His 50 55 60	192
tgc atc cgt gtt gtc aac ggt ctt gac acc gtg atc ggt ctc ctt gac Cys Ile Arg Val Val Asn Gly Leu Asp Thr Val Ile Gly Leu Leu Asp 65 70 75 80	240
gac ccc gac acc ctg aag tcc cag ctc gag cac ttg gcc cag cag cac Asp Pro Asp Thr Leu Lys Ser Gln Leu Glu His Leu Ala Gln Gln His 85 90 95	288
aag gag cgt gat ggc atc cac aag acc cac ttc gac gag atg tcc cac. Lys Glu Arg Asp Gly Ile His Lys Thr His Phe Asp Glu Met Ser His 100 105 110	336
gcc ttc ggc gcc gtc atg ccc cag gtc agc agc tgt ttc aac ccc gat Ala Phe Gly Ala Val Met Pro Gln Val Ser Ser Cys Phe Asn Pro Asp 115 120 125	384
gca tga Ala	390

<210> 20
<211> 129
<212> PRT
<213> Arenicola marina

<400> 20 Cys Cys Ser Ile Glu Asp Arg Lys Glu Val Gln Thr Leu Trp Ser Glu 1 5 10 15
Ile Trp Ser Ala Gln Phe Thr Gly Arg Arg Val Gln Val Ala Gln Ala 20 25 30
Val Phe Glu Asp Leu Phe Arg Arg Asp Pro Glu Ser Lys Asn Leu Phe 35 40 45
Lys Arg Val Asn Val Asp Asp Met Asn Ser Pro Glu Phe His Ala His 50 55 60
Cys Ile Arg Val Val Asn Gly Leu Asp Thr Val Ile Gly Leu Leu Asp 65 70 75 80
Asp Pro Asp Thr Leu Lys Ser Gln Leu Glu His Leu Ala Gln Gln His 85 90 95
Lys Glu Arg Asp Gly Ile His Lys Thr His Phe Asp Glu Met Ser His 100 105 110
Ala Phe Gly Ala Val Met Pro Gln Val Ser Ser Cys Phe Asn Pro Asp 115 120 125

Ala

<210> 21
<211> 20

<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR.

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> A, G, C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> A, G, C ou T

<400> 21
gartgyggnc cnttrcargc 20

<210> 22
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<400> 22
ctcctctcct ctcctttcc t 21

<210> 23
<211> 17
<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> A, G, C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> A, G, C ou T

<400> 23
tgygggnathc tncarcg 17

<210> 24
<211> 18
<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> inosine

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> A, G, C ou T

<400> 24
aargtnaarc anaactgg 18

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<400> 25
tgytgaygya thgargaycg 20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> A, G, C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> A, G, C ou T

<400> 26
aargtnatht tyggnagrga 20

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> A, G, C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> A, G, C ou T

<400> 27
garcaycart gyggnggnga

20

<210> 28
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> A, G, C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> A, G, C ou T

<400> 28
ccangcntcy ttrtcraagc a

21

<210> 29
<211> 19
<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> A, G, C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> A, G, C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> A, G, C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> A, G, C ou T

<400> 29
antgygggcc nctncarcg

19

<210> 30
<211> 18
<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> A, G, C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> A, G, C ou T

<400> 30
ccangcnccd atrtcraa

18

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> A, G, C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> A, G, C ou T

<400> 31
cangcnycrc trttraarca

20

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.